



**Madalena Parreira Cano de Carvalho e Meneses**

Licenciatura em Ciências de Engenharia do Ambiente

## **Biofilmes polimicrobianos em águas ornamentais, potenciais riscos para a saúde pública e estratégias de prevenção**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária

Orientador: Doutora Maria Luísa Jordão, Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA)

Co-orientador: Professor Doutor António Manuel Fernandes Rodrigues, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL)

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Manuel da Hora Santos Coelho

Arguente: Prof. Doutora Maria Aida da Costa e Silva da Conceição Duarte

Vogais: Prof. Doutora Isabel Maria Lopes Pereira Carlos Peres  
Doutora Maria Luísa Forte Marques Jordão



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Abril de 2019**



**Biofilmes polimicrobianos em águas ornamentais, potenciais riscos para a saúde pública e estratégias de prevenção.**

Copyright © Madalena Parreira Cano de Carvalho e Meneses, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia, a Universidade Nova de Lisboa e o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Começo por agradecer à Doutora Luísa Jordão, pelo incessante profissionalismo durante o período de estágio, bem como por todos os conhecimentos que me transmitiu durante a orientação. A sua total disponibilidade foi crucial para a realização deste trabalho.

À Patrícia Morgado, que realizou as colheitas da água; à Irene Matos, pela facultação dos meios de cultura; ao João Rodrigues, que procedeu à identificação dos isolados bacterianos e ao João Brandão e Filipa Ferreira, pela disponibilização da legislação em vigor.

Um agradecimento aos técnicos responsáveis pelo aparelho de medição alternativo (xCELLigence), Delphine Faugaret e colaboradores, pela sua disponibilização e transmissão de conhecimentos.

A todos os professores que me acompanharam durante o meu percurso académico e, em particular, ao professor Doutor António Rodrigues, pela constante cordialidade e todo o conhecimento transmitido.

Gostaria também de agradecer a quem, embora não tenha contribuído diretamente, me apoiou incondicionalmente, os meus pais e irmãos e toda a minha família, os meus amigos e o António.



## Resumo

As águas ornamentais podem funcionar como reservatórios de microrganismos patogénicos, constituindo um risco para a saúde pública. Este trabalho tem, como principal objetivo, avaliar a capacidade de produção de biofilmes *in vitro*, por bactérias potencialmente patogénicas para o Homem, isoladas de águas ornamentais.

As bactérias do estudo pertencem aos géneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Klebsiella* e foram caracterizadas segundo o crescimento a diferentes temperaturas, o tempo de geração, a temperatura ótima de crescimento e a capacidade de produção de biofilmes. A última foi determinada pelo método de cristal violeta, para bactérias isoladas ou em consórcios binários, de isolados do mesmo mês de colheita (co-existentes no ambiente) ou de meses distintos. Adicionalmente, foram comparados, qualitativa e estatisticamente, os resultados do método de cristal violeta (método convencional) e de impedância elétrica (método inovador), na determinação do efeito de *Aeromonas* spp., ou do seu sobrenadante, em biofilmes de *Klebsiella pneumoniae*.

A maioria dos isolados demonstrou crescimento a todas as temperaturas (5, 25, 37 e 45 °C) e todos cresceram preferencialmente a 25 e 37 °C, tendo apresentado tempos de geração inferiores a 88,8 minutos. Quanto à capacidade de formação de biofilme, 25 % dos isolados foram classificados como não produtores ou produtores fracos, 40 % como produtores moderados e 10 % como fortes produtores de biofilme. Em biofilmes binários, 90 % das interações entre bactérias co-existentes no ambiente foram competitivas, contudo, existiu uma maior competição em co-culturas de isolados de meses distintos de colheita. Na comparação entre os dois métodos, a análise qualitativa e a análise estatística apresentaram relações distintas (direta e inversa, respetivamente).

Em suma, estes resultados sugeriram que 75 % dos isolados apresentaram capacidade para produzir biofilmes *in vitro*, o que amplia o risco de infeções no Homem. É, assim, crucial, a tomada de medidas de controlo dos biofilmes no ambiente.

**Palavras-chave:** Águas ornamentais; Bactérias patogénicas; Biofilmes; Infeções; Saúde pública.





## Abstract

The ornamental waters can act as reservoirs of pathogenic microorganisms and constitute a risk to public health. The main objective of this work is to evaluate the capacity of *in vitro* biofilm production by bacteria potentially pathogenic to humans, isolated from ornamental waters.

The bacteria of the study belong to the genera *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* and *Klebsiella* and were characterized according to growth at different temperatures, generation time, the optimal temperature of growth and the ability of biofilm production. The latter was determined by the crystal violet method, for bacteria isolated or in binary consortia, from the same month of harvest (co-existing in the environment) or from different months. Additionally, the results of the violet crystal method (conventional method) and the electrical impedance method (innovative method) were compared qualitatively and statistically for the determination of the effect of *Aeromonas* spp. or its supernatant on *Klebsiella pneumoniae* biofilms.

Most of the isolates grew at all temperatures (5, 25, 37 and 45 °C) and all grew preferentially at 25 and 37 °C, with generation times of less than 88,8 minutes. As for the biofilm formation ability, 25 % of the isolates were classified as non-producers or weak producers, 40 % as moderate producers and 10 % as strong biofilm producers. In binary biofilms, 90 % of the interactions between bacteria co-existing in the environment were competitive, however, there was a higher competition in co-cultures of isolates from distinct months of harvest. In the comparison between the two methods, qualitative and statistical analysis showed distinct relationships (direct and inverse, respectively).

In summary, these results suggested that 75 % of the isolates had the ability to produce biofilms *in vitro*, which can increase the risk of human infections. It is therefore crucial to take measures to control biofilms in the environment.

**Keywords:** Ornamental waters; Pathogenic bacteria; Biofilms; Infections; Public health.



## Índice de matérias

1	Introdução .....	1
1.1	Enquadramento e definição do estudo.....	1
1.2	Objetivo .....	2
1.3	Organização da dissertação.....	2
2	Revisão da literatura .....	3
2.1	A água como vetor de infeção.....	3
2.2	Outras infeções – Águas ornamentais .....	3
2.3	Qualidade da água .....	4
2.3.1	Bactérias potencialmente patogénicas para o Homem.....	5
2.3.2	Eutrofização.....	8
2.4	Biofilmes microbianos .....	9
2.5	Infeções associadas a biofilmes.....	13
2.6	Monitorização da qualidade microbiológica das águas ornamentais e estratégias de intervenção .....	14
3	Materiais e métodos.....	15
3.1	Amostras biológicas .....	15
3.1.1	Isolados bacterianos.....	15
3.2	Avaliação do crescimento bacteriano a diferentes temperaturas .....	16
3.3	Deslizamento em meio semi-sólido (" <i>swarming motility</i> ") .....	16
3.4	Tempo de geração .....	17
3.5	Ensaio de biofilme .....	18
3.6	Análise estatística.....	21
4	Resultados e discussão .....	23
4.1	Caraterização dos isolados identificados .....	23
4.1.1	Crescimento bacteriano a diferentes temperaturas .....	23
4.1.2	Tempo de geração .....	24
4.2	Biofilmes.....	29
4.2.1	Biofilmes de uma espécie .....	29
4.2.2	Biofilmes binários .....	36
5	Conclusões e propostas de intervenção .....	49
6	Perspetivas de trabalhos futuros .....	51
7	Referências bibliográficas .....	53
	Anexos.....	69



## Índice de figuras

Figura 2.1 - <i>E. coli</i> .....	6
Figura 2.2 - <i>K. pneumoniae</i> .....	7
Figura 2.3 - <i>P. aeruginosa</i> .....	7
Figura 2.4 - <i>A. hydrophila</i> .....	8
Figura 2.5 - Ciclo de vida de um biofilme.....	10
Figura 2.6 - Modelos de interações entre espécies.....	11
Figura 3.1 - Crescimento bacteriano: Esquema experimental.....	17
Figura 3.2 - Ensaios de biofilme: Inóculo experimental.....	18
Figura 3.3 - Microplacas para ensaios de impedância elétrica.....	19
Figura 4.1 - Curva de crescimento bacteriano.....	24
Figura 4.2 - Perfis de crescimento de <i>E. coli</i> , <i>Aeromonas</i> spp. e <i>K. pneumoniae</i> .....	25
Figura 4.3 - Temperatura ótima de crescimento.....	27
Figura 4.4 - Cinéticas de formação de biofilmes.....	29
Figura 4.5 - Formação de biofilmes <i>in vitro</i> .....	31
Figura 4.6 - Deslizamento em meio semi-sólido.....	33
Figura 4.7 - Deslizamento em meio semi-sólido: padrões heterogêneos.....	34
Figura 4.8 - Biofilmes binários: Relações entre espécies.....	37
Figura 4.9 - Cooperação entre espécies.....	38
Figura 4.10 - Competição entre espécies.....	39
Figura 4.11 - Biomassa em biofilmes: Isolados de meses diferentes versus Isolados do mesmo mês.....	41
Figura 4.12 - Determinação da concentração ótima: Ensaio de impedância elétrica.....	45
Figura 4.13 - Relação entre índice celular e absorvância.....	46
Figura 4.14 - Efeito de <i>A. sobria</i> ou de <i>A. hydrophila</i> no biofilme de uma <i>Kp</i> .....	46
Figura 4.15 - Análise estatística: Métodos de formação de biofilme.....	47



## Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Qualidade das águas segundo o estado trófico. ....	9
Tabela 3.1 - Isolados bacterianos. ....	15
Tabela 3.2 - Classificação dos isolados consoante a produção de biofilme. ....	19
Tabela 4.1 - Temperaturas de crescimento das espécies. ....	24
Tabela 4.2 - Tempos de geração. ....	26
Tabela 4.3 - Capacidade de formação de biofilme versus deslizamento. ....	35
Tabela 4.4 - Efeito de <i>Aeromonas</i> spp. em biofilmes de <i>K. pneumoniae</i> . ....	43
Tabela I.1 – Distâncias de deslizamento. ....	69





## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Abs.	Absorvância
cn	Controlo negativo
DL	Doença dos legionários
dp	Desvio-padrão
EPS	Substância polimérica extracelular, do inglês <i>extracellular polymeric substance</i>
G	Tempo de geração
g.l.	Graus de liberdade
IC	Índice celular
<i>Kp</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	Meio de Luria-Bertani
MH	Meio de Mueller-Hinton
nm	Nanómetros
OD	Oxigénio dissolvido
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa, do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
rpm	Rotações por minuto
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento, do inglês <i>scanning electron microscope</i>
SDT	Sólidos dissolvidos totais
TSB	Caldo de hidrolisado de soja, do inglês <i>tryptic soy broth</i>
TSI	Índice de estado trófico, do inglês <i>trophic state index</i>
TTC	Cloreto 2, 3, 5 – Trifenil Tetrazólio
UFC	Unidades formadoras de colónias



# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento e definição do estudo

A vida nas áreas metropolitanas, apesar dos benefícios que a cidade oferece, é fatigante. Surge, por isso, e cada vez mais, a necessidade de descontração em espaços verdes e de lazer. Esses espaços oferecem calma e paz e são benéficos para a saúde pública, além de contribuírem para a preservação ambiental.

A presença da água é um fator crucial para o bem-estar do Homem, e, por essa razão, os espaços verdes, normalmente, oferecem esse recurso, em forma de fontes ou lagos artificiais (antropogénicos). No entanto, a água pode funcionar como um reservatório de agentes infecciosos e produtos químicos tóxicos, constituindo um risco para a saúde humana. As crianças, pela sua natureza curiosa, e face à sua vulnerabilidade, têm gerado uma preocupação crescente, pois tendem a interagir com o ambiente circundante, especialmente com patos e peixes presentes nesses lagos, que constituem os principais vetores de contaminação.

A abundância e diversidade da vida microbiana é quase ilimitada <sup>(1)</sup>. As comunidades microbianas são fundamentais para uma infinidade de processos ecológicos, como a fixação de azoto <sup>(2)</sup>, o ciclo global de carbono <sup>(3)</sup> e a degradação de matéria orgânica <sup>(4)</sup>, como por exemplo, de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos <sup>(5)</sup>. Além disso, comunidades como as encontradas no microbiota intestinal de mamíferos são essenciais na saúde e no bem-estar do respetivo hospedeiro <sup>(6, 7)</sup>.

No entanto, diversos estudos epidemiológicos evidenciaram a existência de microrganismos considerados patogénicos para o Homem, como bactérias, vírus e protozoários. Estes microrganismos podem existir em habitats naturais ou antrópicos, como piscinas, sistemas de água potável, cozinhas e unidades prestadoras de cuidados de saúde, tendo, como principais hospedeiros, os seres humanos e os animais <sup>(8-10)</sup>.

Entre os agentes etiológicos mais relevantes de doenças transmitidas pela água, constam espécies de *Legionella* (doença do legionário), *Vibrio* (cólera), *Aeromonas hydrophila* (perturbações gastrointestinais) e *Pseudomonas aeruginosa* (etiologia variada). A redução dos riscos associados a estas infeções depende do controlo da exposição à água contaminada ou, quando possível, do seu tratamento, por forma a remover ou inativar os agentes infecciosos <sup>(11)</sup>.

Os biofilmes são considerados como as organizações mais comuns dos microrganismos em sistemas naturais e consistem na co-existência de uma ou mais espécies num complexo auto-produzido. A transição do estado planctónico para o biofilme está dependente das condições do meio, que muitas vezes não possibilitam o seu crescimento isolado (i.e condições oligotróficas) <sup>(12, 13)</sup>.

## 1.2 Objetivo

A presente dissertação tem, como principal objetivo, a avaliação da produção de biofilmes *in vitro*, tanto individualmente, como em consórcios microbianos, constituídos por mais do que uma espécie bacteriana, presentes numa água ornamental. Essa avaliação foi realizada através da identificação de potenciais sinergias entre os microrganismos, que possam aumentar a sua virulência, ampliando o risco para o Homem, além da comparação entre dois métodos distintos de monitorização de biofilmes.

## 1.3 Organização da dissertação

O presente trabalho apresenta um capítulo introdutório (capítulo 1) que destaca, de um modo abrangente, os temas em foco do estudo.

O capítulo 2 é constituído pela revisão da literatura e tem como propósito aprofundar os temas abordados, com base no descrito na literatura, sendo: a água como vetor de infeção; infeções veiculadas por águas ornamentais; aspetos relevantes acerca da qualidade da água, nomeadamente o enquadramento legislativo e os indicadores de avaliação; os biofilmes microbianos: a sua função e importância no meio; as infeções associadas a biofilmes, e por último, são referidas estratégias de intervenção e monitorização da qualidade microbiológica da água.

No capítulo 3, são descritos os procedimentos experimentais adotados na componente laboratorial, que originaram os resultados, apresentados e discutidos no capítulo 4. Ainda no capítulo 3, é descrita a análise estatística dos resultados.

O capítulo 5 apresenta as conclusões da dissertação e possíveis propostas de intervenção, como a implementação de medidas de melhoria da qualidade das águas, consideradas cruciais na análise dos presentes objetos de estudo.

Por último, no capítulo 6, são referidas as perspetivas de trabalhos futuros, como a aplicação de testes e métodos suplementares, que permitirão a melhor caracterização dos biofilmes e o seu comportamento face a agentes antimicrobianos, essenciais para a prossecução da investigação.

## 2 Revisão da literatura

### 2.1 A água como vetor de infeção

As doenças infecciosas transmitidas pela água constituíam, no início do século XXI, uma das principais causas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo <sup>(14)</sup>. Atualmente, estas doenças continuam a constituir uma causa de mortalidade, principalmente nos países em vias de desenvolvimento, onde o saneamento básico ainda é incipiente. É estimado que mais de 2,4 mil milhões de pessoas vivem sem um sistema adequado de abastecimento de água, em todo o mundo <sup>(15)</sup>. A recolha e tratamento das águas residuais domésticas, a existência de sistemas de drenagem seguros e a sensibilização sobre procedimentos higiénicos, são medidas essenciais para a redução dos riscos associados a essas doenças <sup>(16)</sup>.

Outro fator que pode contribuir para o aumento dos surtos de doenças transmitidas pela água são as alterações climáticas, que afetam o ciclo hidrológico, aumentando a frequência de eventos extremos, como a precipitação excessiva, tempestades, inundações e secas <sup>(17)</sup>. Esses eventos podem comprometer a disponibilidade, o acesso e a qualidade da água, por exemplo, as inundações podem dispersar contaminantes fecais, representando uma ameaça para o Homem <sup>(16)</sup>.

A água potável e as águas recreativas são as principais vias de contacto do Homem com os microrganismos patogénicos <sup>(17)</sup>. Entre os principais agentes responsáveis por infeções no Homem veiculados pela água, são identificadas a *Salmonella typhi* e o *Vibrio cholerae*, agentes etiológicos da febre tifóide e da cólera, respetivamente <sup>(14)</sup>.

A doença dos legionários (DL), identificada na segunda metade do século XX, tem como agente etiológico a *Legionella* spp., nomeadamente a espécie *Legionella pneumophila*, cujo principal reservatório é a água. Na maioria dos casos desta doença, a fonte de transmissão da bactéria para o Homem ocorre em estruturas antropogénicas, como torres de refrigeração, dispositivos de nebulização e piscinas termais, através da inalação de gotículas de água em suspensão, contaminadas com a bactéria (aerossóis) <sup>(18-20)</sup>. O maior surto desta doença registado na Europa ocorreu em novembro de 2014, mais concretamente em três freguesias do concelho de Vila Franca de Xira, situado a 30 km de Lisboa. A identificação de mais de 300 casos conduziu à morte de sete pacientes com doenças subjacentes <sup>(21)</sup>. As investigações epidemiológicas e ambientais identificaram a água proveniente das torres de refrigeração como a fonte provável da disseminação da bactéria <sup>(22)</sup>.

### 2.2 Outras infeções – Águas ornamentais

As águas ornamentais, como lagos artificiais, consistem numa intervenção antropogénica onde se contraria o estado natural de uma área, podendo ser introduzidos seres vivos, como por

exemplo peixes, patos ou tartarugas, modificando o ecossistema natural. Estudos sobre o impacto da introdução de peixes ornamentais evidenciaram a presença de microrganismos potencialmente patogénicos para o Homem <sup>(23-25)</sup>.

Segundo a Convenção na Diversidade Biológica <sup>(26)</sup>, a introdução de espécies exóticas de peixes e outros animais é, não só, uma ameaça à diversidade global e aos habitats naturais, como também à saúde pública, pois estas espécies funcionam, muitas vezes, como vetores de agentes infecciosos. Microrganismos transportados por espécies exóticas são mais propensos à exposição a condições não fisiológicas (fatores de *stress*), podendo desencadear o desenvolvimento de biofilmes, que lhes permitirão sobreviver em habitats não-nativos <sup>(27, 28)</sup>.

Na Península Ibérica, são conhecidos casos, animais e vegetais, em que a introdução de espécies exóticas resultou na alteração do ecossistema em que foram inseridos. O achigã (*Micropterus salmoides*) e o lagostim-vermelho do Louisiana (*Procambarus clarkii*) são exemplos de animais que foram introduzidos, pelo Homem, em rios, lagoas e outros sistemas de água doce. Tanto o achigã como o lagostim são predadores, constituindo a principal ameaça para as espécies nativas mais pequenas que existem nessas áreas <sup>(29)</sup>. Além de predador, o lagostim aproveita as zonas húmidas, particularmente os terrenos pantanosos, onde é cultivado arroz e, com o aumento da temperatura, este animal ataca as plantações de arroz, provocando consideráveis danos económicos <sup>(30, 31)</sup>.

No reino vegetal também se observou a inserção de espécies exóticas, como é o exemplo do jacinto-de-água (*Eichhornia crassipes*), planta proveniente da América do Sul. Esta planta cresce rapidamente, desenvolvendo-se em águas ricas em nutrientes e forma extensos tapetes à superfície da massa de água. Este fenómeno consiste na eutrofização da água, representando uma ameaça para o seu equilíbrio natural e a sua qualidade <sup>(32)</sup>.

## 2.3 Qualidade da água

A água pura é, por definição, um recurso natural incolor, insípido e inodoro, constituindo assim os seus indicadores organoléticos e, por isso, mais facilmente identificáveis. Contudo, para uma adequada análise da qualidade da água, é necessária a determinação de parâmetros físico-químicos como a temperatura, a turvação, os sólidos dissolvidos totais (SDT), o pH, a condutividade, a dureza total, o oxigénio dissolvido (OD), os cloretos, os sulfatos, o azoto e o fósforo <sup>(33)</sup>.

A composição química da água, como a presença de azoto e fósforo, influencia as comunidades microbiológicas, além de interferir no equilíbrio do ecossistema aquático. Estes nutrientes são indispensáveis nas massas de água, dada a sua relevante contribuição para a produtividade biológica <sup>(34)</sup>. O fósforo é o principal nutriente limitante de crescimento em sistemas aquáticos pois, ao contrário do azoto, existem poucas fontes de fósforo na natureza <sup>(35, 36)</sup>. No entanto,

concentrações excessivas podem exercer efeitos negativos na qualidade da água, como a proliferação de fitoplâncton, o que será elucidado num capítulo posterior (“2.3.2 – Eutrofização”).

Além da análise química é importante determinar a qualidade microbiológica da água. A presença de certos microrganismos é indicadora de possíveis contaminações, permitindo a determinação de um índice de qualidade da mesma. A gastroenterite é a perturbação mais comum associada a organismos patogénicos transmitidos pela água <sup>(37, 38)</sup>. Como resultado do perigo potencial para a saúde pública, importa garantir a segurança e a qualidade dessas águas, física, química e microbiologicamente, respeitando o estabelecido nos documentos legais em vigor.

O controlo de qualidade da água é adaptado ao seu uso. Na Europa, não existe documentação legal destinada a águas ornamentais. Ainda assim, existe uma Lei que estabelece a titularidade dos recursos hídricos (Lei n.º 54/2005 <sup>(39)</sup>).

Relativamente à qualidade microbiológica da água, a maioria dos documentos legais é destinada a águas para consumo humano. Ainda que as águas ornamentais não se apliquem a esse fim, importa a sua monitorização, respeitando o Decreto-lei n.º 152/2017 <sup>(40)</sup>, que inclui parâmetros microbiológicos como as bactérias coliformes e *Escherichia coli* (Norma ISO 9308-1 <sup>(41)</sup> ou 9308-2 <sup>(42)</sup>) e *Pseudomonas aeruginosa* (Norma ISO 16266-1 <sup>(43)</sup> ou 16266-2 <sup>(44)</sup>).

Nos Estados Unidos da América, está documentado, pela EPA, um método de monitorização de *Aeromonas* spp. em águas destinadas ao consumo humano (Método 1605 <sup>(45)</sup>).

### 2.3.1 Bactérias potencialmente patogénicas para o Homem

Na análise da qualidade microbiológica da água, são referidos os seguintes grupos de microrganismos, como indicadores comuns de contaminação <sup>(37, 38)</sup>.

#### Coliformes totais e fecais

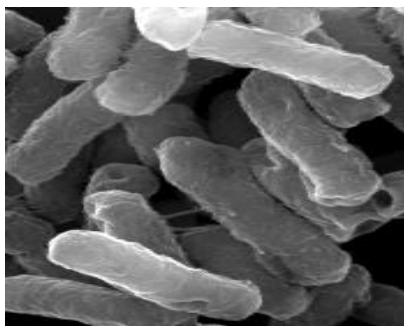
As bactérias coliformes são aeróbias estritas ou anaeróbias facultativas, Gram-negativas, não formam esporos e têm a forma de bastonete <sup>(46)</sup>.

Estas bactérias pertencem à família das *Enterobacteriaceae* e incluem tanto a *Escherichia coli*, como também vários membros dos géneros de *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*. As bactérias referidas integram o microbiota intestinal de seres homeotérmicos. Classicamente, essas bactérias têm sido utilizadas como indicadores de contaminação fecal ou poluição da água através de esgotos, tendo, por essa razão, importância sanitária <sup>(38, 47)</sup>.

- *Escherichia coli*

A espécie bacteriana *Escherichia coli* é um bacilo anaeróbio facultativo <sup>(48)</sup> que faz parte da flora comensal do intestino humano sendo, simultaneamente, um microrganismo patogénico facultativo, podendo provocar infeções gastrointestinais ou urinárias, inclusivamente em hospedeiros humanos imunocompetentes <sup>(48, 49)</sup>. Além disso, estes microrganismos, através da produção de toxinas, que permitem a aderência da bactéria ao epitélio intestinal, podem causar doenças como a diarreia associada à intoxicação alimentar e a septicémia <sup>(48, 49, 50)</sup>.

A *E. coli* (figura 2.1) não tem capacidade para persistir por muito tempo fora do hospedeiro e por esta razão, a sua presença nas massas de água funciona como indicadora de eventos de contaminação fecal recentes <sup>(51)</sup>.



**Figura 2.1 - *E. coli*.**

Micrografia de *E. coli* obtida por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

**Fonte:** Luísa Jordão (não publicado).

- *Klebsiella pneumoniae*

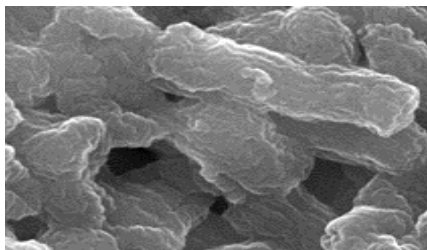
A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria oportunista e anaeróbia facultativa, sendo usualmente encontrada em inúmeros nichos ambientais. Embora existam várias espécies patogénicas de *Klebsiella*, *K. pneumoniae* é a espécie mais relevante do ponto de vista clínico e persiste tanto nos habitats naturais como nos antropogénicos, nomeadamente em unidades prestadoras de cuidados de saúde <sup>(52-54)</sup>.

Esta bactéria apresenta, como hospedeiros principais, os mamíferos <sup>(55)</sup> e, na maior parte das vezes, os indivíduos transportam *K. pneumoniae* na pele, no nariz e na garganta, sem qualquer tipo de manifestação clínica (portadores assintomáticos) <sup>(56)</sup>.

A *K. pneumoniae* causa, com frequência, infeções no sistema urinário, septicémia ou pneumonia em indivíduos imunocomprometidos e é responsável por mais de 10 % das infeções bacterianas hospitalares, cujas complicações se devem à sua frequente e crescente resistência a muitos antimicrobianos <sup>(57, 58, 59)</sup>. Uma vez estabelecida a infeção, esta espécie bacteriana forma um biofilme que conduz à perda das defesas do hospedeiro <sup>(52)</sup>.



Esta espécie bacteriana é apresentada na figura 2.2.



**Figura 2.2 - *K. pneumoniae*.**  
Micrografia de *Kp* obtida por SEM.  
**Fonte:** Luísa Jordão (não publicado).

#### Outros indicadores utilizados

##### ❖ *Pseudomonas* spp.

As *Pseudomonas* spp. foram identificadas, pela primeira vez, pelo professor Migula no final do século XIX, como um género constituído por células com órgãos de mobilidade polar, estritamente aeróbios e com capacidade de formação de esporos <sup>(60)</sup>. No século XX, a descrição das *Pseudomonas* foi aprofundada, acrescentando que, além de aeróbias estritas, são também capazes de realizar a desnitrificação <sup>(61, 62)</sup>. Este género é metabolicamente diverso, o que conduz à sua capacidade para colonizar uma ampla gama de hospedeiros, afetando a sua patogenicidade. Estes microrganismos são maioritariamente saprófitas, podendo ser patogénicos oportunistas em animais e humanos <sup>(63, 64)</sup>. A capacidade de produzirem esporos, descrita por Migula, foi considerada um fenómeno raro, por Palleroni no século XXI <sup>(60)</sup>.

*Pseudomonas* spp. (figura 2.3) são frequentemente isoladas de massas de água. Contudo, contrariamente aos indicadores anteriores, a sua presença não representa, necessariamente, um risco para a saúde pública. Em águas recreativas, têm sido isoladas algumas espécies de *Pseudomonas* com capacidade de provocar infeção no Homem, sendo, por isso, propostas como indicadoras da qualidade destas águas <sup>(37)</sup>.



**Figura 2.3 - *P. aeruginosa*.**  
Micrografia de *P. aeruginosa* obtida por SEM.  
**Fonte:** Luísa Jordão (não publicado).

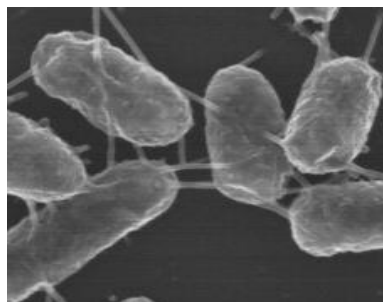
❖ *Aeromonas* spp.

O género *Aeromonas* compreende bactérias Gram-negativas e anaeróbias facultativas, da família das *Aeromonadaceae* <sup>(65-67)</sup>. A taxonomia das *Aeromonas* spp. é complexa e encontra-se em mudança desde a introdução de novos critérios de identificação, o que conduziu à descrição de novas espécies e reclassificações das espécies conhecidas <sup>(65)</sup>.

Estas bactérias surgem naturalmente em rios e lagos, águas residuais brutas/tratadas e água potável <sup>(68)</sup>. Além disso, as *Aeromonas* spp., podem subsistir, igualmente, em alimentos <sup>(66)</sup>.

Com o envelhecimento da população e consequente défice do sistema imunitário, as infeções associadas a algumas espécies de *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. schubertii*) têm aumentado. Entre estas, são encontradas infeções gastrointestinais, cutâneas, de tecidos moles, sistema respiratório/urinário, e foram igualmente descritos casos fatais <sup>(66, 69-73)</sup>.

Face às infeções associadas a este género bacteriano, a necessidade de erradicação destas bactérias conduziu a estratégias de desinfeção, tendo sido demonstrado que algumas espécies de *Aeromonas* spp. (figura 2.4) são resistentes ao cloro, nas concentrações utilizadas na desinfeção de água destinada ao consumo humano <sup>(74)</sup>.



**Figura 2.4 - *A. hydrophila*.**  
Micrografia de *A. hydrophila* obtida por SEM.  
**Fonte:** Castro e colaboradores <sup>(75)</sup>.

### 2.3.2 Eutrofização

A eutrofização é o processo, natural ou antropogénico, pelo qual uma massa de água adquire uma grande concentração de nutrientes, especialmente azoto e fósforo, promovendo o crescimento de algas e plantas aquáticas <sup>(76)</sup>.

A aplicação inicial do termo derivou da aparência dos lagos, da depleção de oxigénio nas camadas profundas e das principais espécies de macroinvertebrados bentónicos existentes. O problema foi reconhecido pela proliferação de algas, o crescimento de macrófitas e a morte periódica de peixes <sup>(77)</sup>.

Carlson <sup>(78)</sup> utilizou uma nova abordagem de classificação trófica de lagos e reservatórios, com base em critérios como o enriquecimento em nutrientes, a produtividade algal e a profundidade do disco de Secchi. O autor classifica estas massas de água através de um valor que varia entre 0 e 100 (índice do estado trófico – do inglês *Trophic state index* – TSI), onde o menor valor remete para uma menor produtividade e vice-versa, e baseia-se em três classes de denominação do estado trófico: oligotrófico - produtividade baixa; mesotrófico - produtividade moderada e eutrófico – produtividade alta.

Alemayehu e Hackett <sup>(79)</sup> utilizaram intervalos de valores do TSI para avaliação da qualidade da água, relativamente aos critérios anteriormente referidos, acrescentando uma classe de estado trófico (tabela 2.1).

**Tabela 2.1 - Qualidade das águas segundo o estado trófico.**

Intervalo de valores do TSI	Classificação do estado trófico	Qualidade da água
0-59	Oligotrófico para mesotrófico	Boa
60-69	Mesotrófico para eutrófico	Razoável
70-100	Hiper-eutrófico	Fraca

O controlo do fósforo e do azoto em águas superficiais é fundamental para manter a qualidade desejável da água e a integridade do ecossistema, sendo que o enriquecimento por estes nutrientes interage com muitas condições específicas do local, especialmente com a estabilidade ecológica do sistema e com a presença de outros contaminantes, incluindo os agentes de doenças infecciosas <sup>(77, 80)</sup>.

O excesso destes micronutrientes na água poderá conduzir ao aparecimento de algas e de bactérias aeróbias, além do florescimento de cianobactérias. Esse florescimento é indesejável, pois as cianobactérias impedem a transparência da água, dificultando a sua eficiente oxigenação (atingindo muitas vezes condições de hipóxia), o que promove o aparecimento de cianotoxinas, produtos tóxicos que conduzem ao desequilíbrio do ecossistema, provocando a morte de peixes e de outros animais <sup>(79, 81)</sup>.

A existência de fósforo nas massas de água pode provir da ação do Homem, através de agentes como resíduos, detergentes, fertilizantes ou erosão <sup>(79, 81, 82)</sup>. O crescimento excessivo das plantas associado a este fenómeno, há algum tempo que se considera constituir o principal problema enfrentado pelas águas superficiais <sup>(83, 84)</sup>.

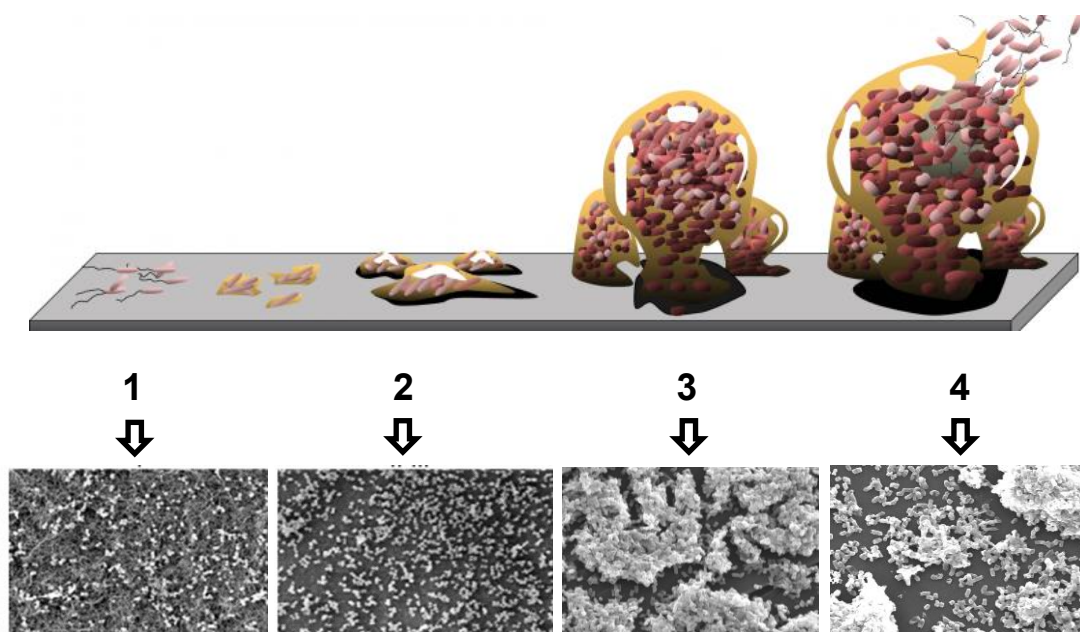
## 2.4 Biofilmes microbianos

As bactérias são, normalmente, estudadas na forma planctónica, *in vitro*, como culturas puras. Contudo, aproximadamente 99 % dos microrganismos existentes na Terra estão organizados

em comunidades microbianas conhecidas como biofilmes, consórcios microbianos sésseis, compostos, na maioria dos casos, por espécies distintas de microrganismos (como bactérias, algas, fungos e protozoários), envolvidos por uma matriz polimérica auto-produzida <sup>(85-87)</sup>. Essa matriz pode, ou não, estar ligada a superfícies bióticas (órgãos de plantas ou animais), ou abióticas, como rochas ou paredes <sup>(88, 89)</sup> e promove a aderência, oferece proteção física e facilita a interação social entre os microrganismos, criando um microhabitat contra a predação <sup>(8, 90, 91)</sup>. As bactérias, quando organizadas em biofilme, podem apresentar características, genótípicas e/ou fenotípicas, diferentes do seu correspondente planctônico <sup>(90, 92, 93)</sup>.

Os microrganismos presentes nos biofilmes são mais resistentes a alterações de pH e temperatura, escassez de nutrientes e a outros fatores de *stress*, como desinfetantes e antibióticos, do que os microrganismos planctônicos, razão pela qual a formação de biofilme é considerada uma estratégia de sobrevivência <sup>(89, 94-96)</sup>.

O'Toole e colaboradores <sup>(97)</sup> descreveram que a formação inicial do biofilme resulta da capacidade que as bactérias apresentam para formar um contacto célula-célula e célula-superfície. As fases de crescimento de um biofilme e as respectivas imagens por microscopia de varrimento (SEM) são apresentadas na figura 2.5.



**Figura 2.5 - Ciclo de vida de um biofilme.**

As fases de desenvolvimento de um biofilme estão representadas para **1** – Aderência reversível; **2** – Aderência irreversível; **3** – Maturação I e II; **4** – Dispersão. As micrografias obtidas por SEM ilustram as diferentes fases de formação de um biofilme de *K. pneumoniae*, em poliestireno <sup>(98)</sup>.

**Adaptado de:** Monroe <sup>(99)</sup>.

A aderência das bactérias planctônicas a uma superfície é condicionada pela existência de forças de atração e repulsão entre as duas, e o movimento dos microrganismos em direção às superfícies pode resultar da gravidade, do fluxo da água, da mobilidade e da quimiotaxia dos microrganismos, ou de uma combinação destes processos <sup>(13,100)</sup>. Na aderência irreversível, as

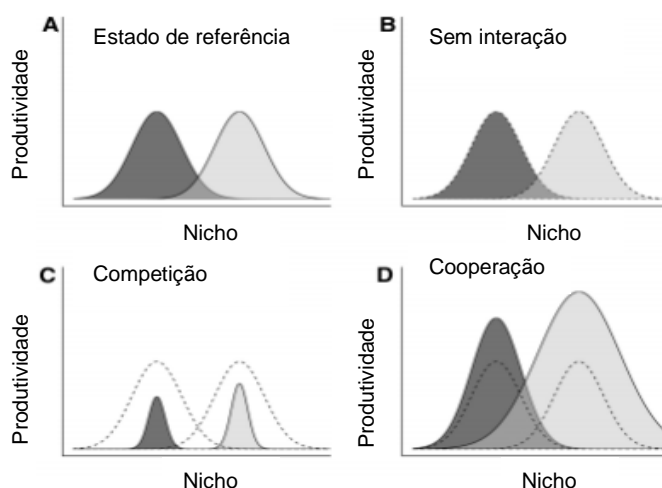
bactérias desenvolvem estruturas celulares envolvidas num complexo de polissacarídeos, proteínas, glico-péptidos, ácidos nucleicos e lípidos, formando agregados na superfície onde aderem <sup>(94, 101, 102)</sup>.

A fase de maturação é marcada pela formação de microcolónias e pelo desenvolvimento da arquitetura do biofilme <sup>(103)</sup>. À medida que os biofilmes amadurecem, a dispersão das bactérias do biofilme para o estado planctónico pode resultar de vários fatores, como alterações na disponibilidade de nutrientes, variações de oxigénio dissolvido, aumento de produtos tóxicos ou outras condições de *stress*. As células do biofilme podem retornar a um estilo de vida planctónico para completar o ciclo de desenvolvimento do biofilme <sup>(104-107)</sup>.

As interações entre as diferentes espécies influenciam a estrutura, função e dinamismo dos biofilmes <sup>(8, 108)</sup>, pelo que a formação de um biofilme maduro estável é o produto de interações sociais que evoluíram através de adaptações, tanto em biofilmes de uma espécie, como em polimicrobianos <sup>(109)</sup>.

Nos biofilmes polimicrobianos podem existir interações antagónicas (competição relativamente aos recursos ou produção de compostos inibitórios) <sup>(110)</sup> ou sinérgicas (indução de biofilme ou a resistência aumentada) <sup>(89)</sup>. Além disso, foi observado que algumas espécies foram incapazes de formar biofilmes isoladamente, tendo tido, contudo, a capacidade de se agregar em biofilmes, aumentando a sua biomassa <sup>(111-113)</sup>.

A figura 2.6 resume, graficamente, as interações entre espécies bacterianas, organizadas em biofilmes.



**Figura 2.6 - Modelos de interações entre espécies.**

A produtividade de duas espécies bacterianas é apresentada num eixo de nicho ecológico. É observado em (A) o estado de referência, (B) ausência de interação, (C) competição e (D) cooperação.

**Adaptado de:** Foster e Bell <sup>(114)</sup>.

A produtividade de duas espécies é apresentada num eixo de nicho ecológico, figura 2.6, onde: (A) o estado de referência é o espaço inicial do nicho ocupado pelas duas espécies; (B) a ausência de interação não afeta a produtividade das espécies com a presença de outras; (C) a

existência de interações negativas, como a competição mútua entre as duas espécies (relação antagônica), pode conduzir à alteração dos nichos de algumas espécies e a produtividade geral da comunidade é reduzida; (D) a existência de interações positivas, como a cooperação mútua (relação sinérgica) promove o benefício mútuo das espécies e a produtividade geral da comunidade aumenta <sup>(114)</sup>.

Os mesmos autores afirmam ainda que, quando não existe interação entre as espécies, é previsto que a produtividade de uma mistura binária seja exatamente a soma de duas espécies isoladas, como ocorreria, por exemplo, se duas espécies ocupassem nichos independentes <sup>(114)</sup>.

A soma da produtividade de cada espécie, isolada, é designada por nula, para comparação com a produtividade observada no consórcio correspondente de duas espécies. Se duas espécies forem mutuamente competitivas, a produtividade do consórcio será menor que a da nula e se duas espécies forem mutuamente cooperativas e promoverem o crescimento uma da outra, a produtividade do consórcio será maior do que essa nula <sup>(114)</sup>.

Contudo, algumas das interações positivas podem envolver uma espécie, obtendo aumentos de produtividade em consórcio, enquanto as outras espécies causam diminuições na sua produtividade. Algumas das interações negativas podem também incluir casos em que uma espécie é beneficiada e a outra prejudicada. Nestes casos, os efeitos negativos são dominantes <sup>(114)</sup>.

Um estudo realizado com um biofilme polimicrobiano constituído por *Staphylococcus simulans*, *Lactobacillus fermentum*, *Pseudomonas putida*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, constitui um exemplo em que um dos membros do consórcio, *P. putida*, contribuiu mais para o biofilme, aumentando a sua biomassa em comparação com a nula. Contudo, *S. enteritidis* obteve menos biomassa no biofilme do que no seu correspondente planctónico <sup>(115)</sup>. Noutro estudo, foi demonstrado que a formação do biofilme por *Salmonella* spp. pode ser promovida pela presença de outras bactérias <sup>(116)</sup>.

As interações bacterianas, bem como os comportamentos coletivos de isolados num biofilme polimicrobiano, são regulados pelo *quorum sensing*, processo de comunicação bacteriana (célula-célula). Este processo é baseado na produção, libertação e deteção, no biofilme, de pequenas moléculas sinalizadoras (EPS), denominadas de auto-indutores, que regulam a expressão de vários genes <sup>(117-119)</sup>. As bactérias possuem mecanismos internos, mediados por recetores, para detetar a concentração dessas moléculas. As bactérias planctónicas produzem auto-indutores numa taxa baixa, que aumenta e se acumula no ambiente quando várias células bacterianas se agrupam. Quando o nível dessa taxa é suficientemente elevado, o sinal de *quorum* é detetado pelas bactérias sésseis atuais, o que promove a transmissão da mensagem a outras células próximas <sup>(95, 120, 121)</sup>.

Diggle e colaboradores <sup>(95)</sup> especificaram que, para que uma molécula seja classificada como um sinal de *quorum* (EPS), existem quatro critérios a atender, como: **(A)** A produção do sinal de *quorum sensing* deve ocorrer durante estágios específicos de crescimento ou em resposta a mudanças ambientais particulares; **(B)** O sinal de *quorum* deve acumular-se no ambiente extracelular e deve ser reconhecido por um recetor bacteriano específico; **(C)** A acumulação de uma concentração limite crítica do sinal sensível ao *quorum* deve estimular uma resposta combinada; **(D)** A resposta celular deve estender-se além das mudanças fisiológicas necessárias para metabolizar ou desintoxicar a molécula.

Em várias espécies bacterianas, a rutura do sistema de deteção de *quorum* afetou a formação do biofilme. Por exemplo, em *P. aeruginosa*, a inativação do *quorum* tem consequência na formação dos biofilmes, que são menos estruturados e planos do que os observados habitualmente. Além disso, quando este sinal é interrompido, os biofilmes tornam-se mais suscetíveis ao tratamento com biocidas e antimicrobianos <sup>(95)</sup>.

## 2.5 Infecções associadas a biofilmes

Os biofilmes ocorrem numa ampla variedade de ambientes naturais e antropogénicos e têm sido vistos como reservatórios de agentes potencialmente patogénicos e responsáveis por infeções no Homem <sup>(85)</sup>.

As infeções bacterianas agudas, associadas a biofilmes, normalmente envolvem bactérias planctónicas e, geralmente, o seu tratamento com antimicrobianos é possível, embora dependa de um diagnóstico rápido e preciso <sup>(96)</sup>. As infeções crónicas podem resultar da capacidade de formação de biofilmes no hospedeiro humano ou através de dispositivos médicos aí colocados, como cateteres ou implantes e o seu tratamento com antimicrobianos é mais difícil <sup>(96, 122)</sup>. Têm sido descritas infeções na cavidade oral, na pele, na corrente sanguínea e no sistema urinário <sup>(96, 123, 124)</sup>, podendo conduzir à morte <sup>(125-128)</sup>.

Embora a comunidade médica e científica estejam cientes do impacto provocado pelas infeções associadas a biofilmes na saúde pública, o(s) mecanismo(s) que desencadeia(m) a infeção por membros destas comunidades microbianas ainda é(são) pouco (ou nada) conhecido(s). Contudo, algumas características potenciadas por biofilmes que podem ser importantes nos processos de infeções, já foram identificadas. Entre estas são encontradas: o descolamento de células ou agregados de biofilme, que pode resultar em infeções da corrente sanguínea ou do trato urinário, ou dar origem a embolias; o aumento da resistência a agentes antimicrobianos; a produção de endotoxinas, pelas bactérias Gram-negativas, em biofilme; os biofilmes são resistentes ao mecanismo de depuração do sistema imunitário do hospedeiro <sup>(129)</sup>.

O reconhecimento por parte dos microbiologistas clínicos e especialistas em saúde pública de que os biofilmes microbianos são onnipresentes na natureza, resultou no estudo de vários

processos de doenças infecciosas associadas a biofilmes. Endocardite, otite média, periodontite e prostatite crônica parecem ser causadas por microrganismos consorciados em biofilmes <sup>(130)</sup>.

## 2.6 Monitorização da qualidade microbiológica das águas ornamentais e estratégias de intervenção

A ausência de legislação específica para águas ornamentais conduz a pesquisas com foco na redução dos riscos associados a infeções no Homem, transmitidas pelas bactérias patogénicas, através da prevenção e controlo de biofilmes microbianos, sem ser comprometido o equilíbrio do ecossistema, pois a existência de biofilmes, além de impactos na saúde pública, tem também sérios impactos económicos e ambientais <sup>(85, 131)</sup>.

Os biofilmes estão envolvidos em muitos problemas de incrustação, corrosão e higiene, sendo necessária a adoção de estratégias com foco no seu controlo ou, quando possível, na sua erradicação. A rugosidade das superfícies pode afetar a aderência do biofilme, pelo que superfícies menos rugosas diminuem a propensão para a formação e maturação do biofilme <sup>(131, 132)</sup>. Além disso, o revestimento das paredes pode constituir um fator importante na redução/eliminação da bioincrustação, o que foi comprovado em estudos que utilizaram diferentes revestimentos <sup>(133-136)</sup>.

Além da superfície de aderência do biofilme, a introdução de determinadas plantas nestas águas é importante na inibição ou redução do biofilme de algumas bactérias, pelo que secretam compostos que inibem o *quorum sensing* das bactérias em biofilme <sup>(137-143)</sup>.

É necessária a implementação de um sistema de filtração no ponto de alimentação destas águas ornamentais, quando possível. Dessa forma, a introdução de uma membrana filtrante pode contribuir significativamente para a melhoria da qualidade da água <sup>(144)</sup>.

A prática de desinfecção primária e a garantia de manutenção de um residual de desinfetante são estratégias muito utilizadas para o controlo de contaminantes microbianos <sup>(145)</sup>. A desinfecção de águas com dióxido de cloro e clorito, por exemplo, pode reduzir a concentração de bactérias planctónicas, mas tem pouco ou nenhum efeito sobre a concentração de bactérias do biofilme <sup>(146)</sup>. Keevil e colaboradores <sup>(147)</sup> relataram que os organismos coliformes em biofilme podem sobreviver à exposição prolongada de 12 mg/l de cloro livre (concentração recomendada de cloro residual livre para água potável: 0,2-0,6 mg/l (Decreto-Lei nº 152/2017 <sup>(40)</sup>). Assim sendo, é reforçada a importância da monitorização da qualidade da água <sup>(148)</sup>.



### 3 Materiais e métodos

Neste trabalho, foram utilizadas amostras selecionadas de um estudo anterior, em que foram colhidas amostras de água superficial e biofilmes, durante um período de um ano (março de 2016 até fevereiro de 2017), provenientes de um lago ornamental situado num parque na região de Lisboa <sup>(149)</sup>. A amostragem de água superficial foi efetuada para um frasco estéril (100 ml) e os biofilmes foram colhidos com zaragatoas estéreis, numa área de 10 cm<sup>2</sup> (cimento), conforme descrito por Nascimento e colaboradores <sup>(27)</sup>.

#### 3.1 Amostras biológicas

##### 3.1.1 Isolados bacterianos

Os isolados ambientais em estudo provêm de quatro géneros bacterianos: *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. e *Klebsiella* spp. (tabela 3.1).

**Tabela 3.1 - Isolados bacterianos.**

Isolados		Origem	Data de colheita	
Espécie	ID		Mês	Ano
E. coli	40	Biofilme	junho	2016
	41	Água	agosto	
	42	Água	setembro	
	43	Biofilme	outubro	
P. aeruginosa	51	Biofilme	julho	2016
P. putida	52	Biofilme	outubro	
	53	Biofilme		
P. oryzihabitans	57	Biofilme	fevereiro	2017
A. veronii	13	Biofilme	julho	2016
A. sobria	15	Biofilme	agosto	
	16	Biofilme	setembro	
	19	Água	outubro	
A. hydrophila/caviae	24	Água	janeiro	2017
A. sobria	29	Biofilme	fevereiro	
	32	Água	fevereiro	
K. pneumoniae	45	Água	junho	2016
	46	Biofilme	julho	
	47	Água	agosto	
	48	Água	setembro	
	49	Biofilme	outubro	
	50	Biofilme	outubro	

Todos os isolados foram cultivados em caldo de Mueller-Hinton (MH) ou em agar de Mueller-Hinton (Difco), com o objetivo de se preparar um stock bacteriano. As bactérias foram conservadas em caldo de hidrolisado de soja (TSB) com 20 % de glicerol a -20 °C e em meio semi-sólido de conservação de estirpes (gelose peptonada), à temperatura ambiente. Todos os

ensaios foram realizados a partir de culturas frescas (incubadas durante cerca de 18 horas, a 37 °C), de um destes stocks bacterianos.

### 3.2 Avaliação do crescimento bacteriano a diferentes temperaturas

A inoculação foi realizada a partir do stock à temperatura ambiente em agar de MH, com posterior incubação a 5, 25, 37 e 45 °C, durante um período aproximado de 18 horas, ou até ser detetado crescimento. O ensaio não foi quantitativo, tendo sido apenas avaliada a presença ou ausência de unidades formadoras de colónias (UFC).

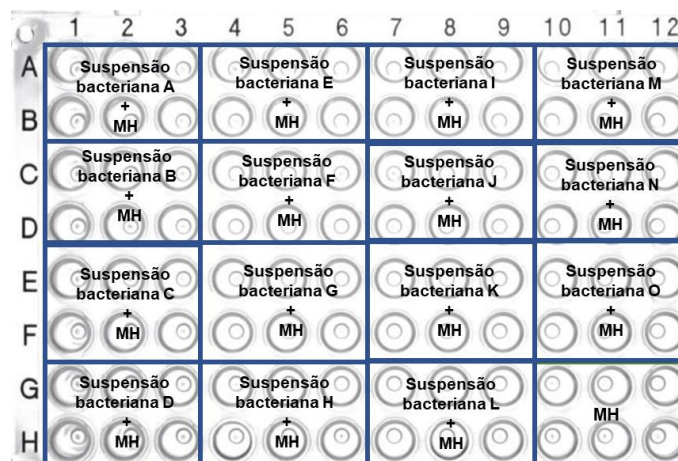
### 3.3 Deslizamento em meio semi-sólido (“*swarming motility*”)

O deslizamento de *Aeromonas* spp., *K. pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. e *E. coli* foi avaliado em meios semi-sólidos, descritos em trabalhos anteriores. Para *Aeromonas* spp., foi utilizado o meio descrito por Gavín e colaboradores <sup>(150)</sup>, composto por 1 % de triptona, 0,5 % cloreto de sódio (NaCl) e 0,25 % de agar bacteriológico (Difco). Para *K. pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. e *E. coli*, foi utilizado meio Luria-Bertani (LB) com 0,3 % de agar <sup>(151)</sup>. A todos os meios foi adicionado 0,05 % de cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (TTC), para facilitar a visualização do deslizamento bacteriano.

Com o auxílio de uma ansa estéril de 1 microlitro (µl), foi inoculada, no meio de cultura apropriado, uma unidade formadora de colónias (UFC), por perfuração no centro da placa. As placas foram incubadas a duas temperaturas (25 e 37 °C), durante 18 horas. O deslizamento foi avaliado através da medição da distância máxima percorrida pelas bactérias. Para 25 °C, foi efetuada uma nova avaliação após 5 dias.

### 3.4 Tempo de geração

Foi preparada uma suspensão bacteriana com uma concentração inicial de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Numa microplaca de 96 poços (Nunc™), foram inoculados 20 µl de suspensão bacteriana em 180 µl de caldo de MH, de forma a obter uma concentração final de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. O caldo de MH foi utilizado como controlo de esterilidade. O ensaio foi realizado em hexaplicado, seguindo uma organização semelhante à apresentada na figura 3.1.



**Figura 3.1 - Crescimento bacteriano: Esquema experimental.**

O esquema experimental é apresentado para o ensaio do crescimento e para os hexaplicados dos inóculos bacterianos.

As placas foram incubadas a 25 e a 37 °C, tendo o crescimento sido avaliado através da leitura da absorvância a 600 nm, num leitor de placas (*Multiskan Ascent V1.24 354-00958*), decorridos intervalos de tempo variáveis, até ser atingida a fase estacionária de crescimento, ou 24 horas.

Os valores de absorvância (Abs) foram convertidos para concentração bacteriana, com base no seguinte fator de conversão <sup>(152)</sup>:

$$\text{Abs.}_{600 \text{ nm}} = 0,2 \leftrightarrow 1 \times 10^8 \text{ bactérias}$$

A determinação do tempo de geração (G), com base na fase de crescimento exponencial de cada isolado, é apresentada de seguida <sup>(153)</sup>.

Expressão matemática de crescimento (equação 1):

$$N = N_0 * 2^n \quad (\text{eq. 1})$$

A transformação logarítmica da equação 1 é a seguinte:

$$\log N = \log N_0 + n \log 2 \quad (\text{eq. 2})$$

Resolvendo em ordem a  $n$  (equação 3):

$$n = \left( \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \right) \leftrightarrow \left( \frac{\log N - \log N_0}{0.301} \right) \leftrightarrow \left( \frac{1}{0.301} \right) * (\log N - \log N_0) \leftrightarrow 3.3 * \log \frac{N}{N_0} \quad (\text{eq. 3})$$

O tempo de geração ( $G$ ) corresponde ao quociente entre o tempo ( $t$ ) e o número de gerações ( $n$ ).

$$G = \frac{t}{n}$$

Substituindo o  $n$  na equação 3, surge a seguinte expressão:

$$G = \frac{t}{3.3 * \log \frac{N}{N_0}} \quad (\text{eq. 4})$$

Onde:

$N_0$  – Número inicial de bactérias

$N$  – Número de bactérias após  $n$  gerações

$n$  – Número de gerações

$t$  – Tempo, em minutos

O tempo de geração das bactérias foi calculado com recurso à equação 4 e encontra-se expresso em minutos.

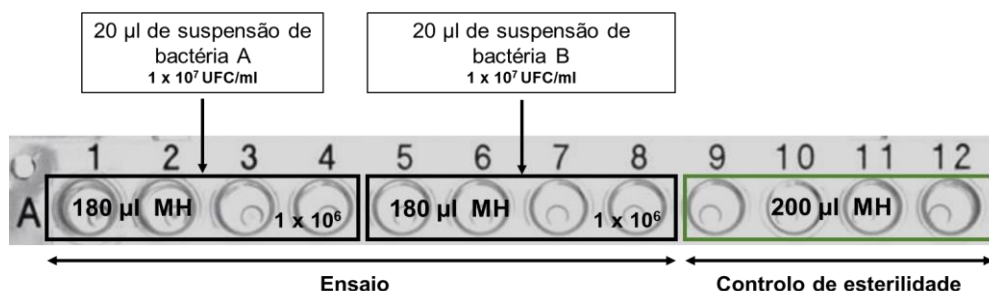
## 3.5 Ensaios de biofilme

### 3.5.1 Biofilmes de uma espécie

#### Método convencional

A formação de biofilmes pelos isolados bacterianos em estudo foi analisada através do método descrito por Nascimento e colaboradores <sup>(27)</sup>, com algumas modificações.

Foi preparada uma suspensão bacteriana com  $1 \times 10^8$  UFC/ml, que foi diluída em caldo de MH, de forma a obter uma concentração final de  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Os volumes inoculados foram idênticos aos do ensaio anterior. O ensaio foi realizado em hexaplicado e o controlo de esterilidade foi o caldo de MH (200  $\mu$ l). Um exemplo do esquema de inoculação utilizado nos ensaios é apresentado na figura 3.2.



**Figura 3.2 - Ensaios de biofilme: Inóculo experimental.**  
O esquema apresenta as diluições realizadas.

A formação de biofilme foi avaliada após 2, 4, 6, 8 e 24 horas de incubação a 37 °C. No final de cada período de incubação, o meio foi removido e os poços foram lavados (três vezes), com água destilada, para eliminar as bactérias não aderentes. O biofilme foi corado com 100 µl de uma solução de cristal violeta (1,4 %), durante 15 minutos. O excesso de corante foi removido por lavagem com água destilada (3 vezes). O excesso de água foi removido e o cristal violeta foi dissolvido em etanol a 95 % (200 µl) (Merck), durante 15 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 570 nm, no leitor de placas.

Os isolados foram classificados quanto à sua capacidade de formação de biofilme, de acordo com o descrito por Stepanović e colaboradores <sup>(154)</sup>. De uma forma sintetizada, foi comparada a absorvância dos isolados com o controlo de esterilidade (controlo negativo), como apresentado na tabela 3.2.

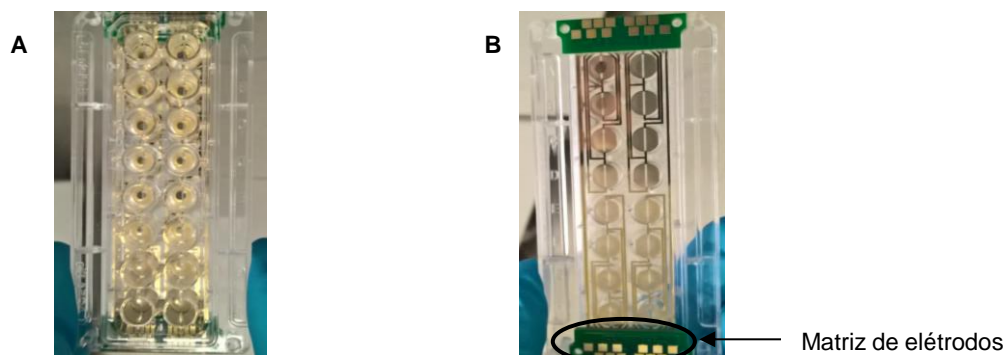
**Tabela 3.2 - Classificação dos isolados consoante a produção de biofilme.**

Classificação do isolado	Valores de absorvância
Não produtor	Abs. isolado $\leq$ Abs. corte
Produtor fraco	Abs. corte $<$ Abs. isolado $\leq$ 2Abs. corte
Produtor moderado	2Abs. corte $<$ Abs. isolado $\leq$ 4Abs. corte
Produtor forte	Abs. isolado $>$ 4Abs. corte

O ponto de corte para a formação de biofilme (Abs. corte) foi definido como a média do controlo negativo (cn), somando-se a 3 vezes o respetivo desvio-padrão ( $dp_{cn}$ ) (Abs. corte = Abs. cn +  $3dp_{cn}$ ).

### Método de medição da impedância elétrica

Além do método anterior, foi avaliada a formação de biofilme através da determinação da impedância elétrica para um número reduzido de isolados: *A. sobria* 16, *E. coli* 42 e *Kp* 48. Inicialmente, foram testadas concentrações bacterianas:  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  UFC/ml, para se determinar a concentração ótima para este método. O ensaio foi realizado em microplacas de 16 poços, com matrizes de elétrodos de ouro microfabricados, apresentadas na figura 3.3, tendo sido utilizado o controlo de esterilidade acima referido (100 µl). A impedância elétrica foi monitorizada de 5 em 5 minutos, durante 19 horas, no aparelho xCELLigence® Real-Time Cell Analysis (ACEA, Biosciences Inc.). O ensaio foi realizado em duplicado.



**Figura 3.3 - Microplacas para ensaios de impedância elétrica.**

É apresentada em (A), a parte da frente das placas, e em (B) o verso das placas, bem como a matriz de elétrodos.

A impedância do fluxo de elétrons (impedância elétrica), causada por células microbianas aderentes, foi caracterizada pela utilização de um parâmetro adimensional denominado por índice celular (IC), cuja equação se apresenta abaixo (equação 5) <sup>(155)</sup>.

$$IC = \frac{(R_n - R_b)}{\text{Valor de impedância nominal}} \quad (\text{eq. 5})$$

Onde:

$R_n$  – Impedância entre o eletrodo e a célula no poço, quando contém células ( $\Omega$ );

$R_b$  – Impedância entre o eletrodo e a célula no poço inicialmente (sem células) ( $\Omega$ );

Impedância nominal – 15  $\Omega$ .

### 3.5.2 Biofilmes binários

Foi preparado um inóculo bacteriano com contribuições iguais de cada um dos membros do consórcio microbiano. Para um volume total de 1,5 ml, e uma concentração final de  $1 \times 10^6$  UFC/ml, por isolado, cada um contribuiu com 750  $\mu$ l.

A suspensão bacteriana dos isolados foi homogeneizada num vórtex (concentração final de  $1 \times 10^6$  bactérias/ml) e foi inoculada na microplaca (20  $\mu$ l), com os 180  $\mu$ l de caldo de MH. O volume do controle de esterilidade foi de 200  $\mu$ l.

Após 2, 4, 6, 8 e 24 horas de incubação a 37 °C, foi monitorizada a formação de biofilme a uma absorvância de 570 nm, como descrito anteriormente, pelo método convencional, de coloração com cristal violeta.

#### 3.5.2.1 Avaliação do efeito de *Aeromonas* spp. em biofilmes maduros de *K. pneumoniae*

O presente ensaio teve, como principal objetivo, a caracterização do efeito de isolados de *A. sobria* 16 e *A. hydrophila* 24, e/ou dos seus sobrenadantes, em biofilmes maduros dos 6 isolados de *K. pneumoniae* (Kp 45 a 50).

Os biofilmes foram preparados como descrito anteriormente, em quadruplicado (método convencional) e duplicado (método de impedância elétrica). Decorridas 8 horas (método convencional), ou 10 horas (método de impedância elétrica), foram retirados 150  $\mu$ l dos poços com biofilmes de *K. pneumoniae*, tendo sido substituídos por *A. sobria* 16, *A. hydrophila* 24 ou pelos seus sobrenadantes. Os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação a 3 000 rpm, durante 30 minutos (Megafuge 1.0, Herareus) de uma cultura fresca (18 horas), de cada uma das *Aeromonas*.

As placas foram incubadas a 37 °C e foi monitorizada a formação de biofilme pelo método convencional ou através da medição da impedância elétrica.

Pelo método convencional, após 24, 48 e 72 horas de incubação a 37 °C, foi monitorizada a formação de biofilme a uma absorvância de 570 nm, conforme descrito em 3.5.1.

Pelo método de medição da impedância elétrica, o efeito das *Aeromonas* spp. em biofilmes de *K. pneumoniae* foi monitorizado de 25 em 25 minutos, durante, aproximadamente, quatro dias (100 horas).

### 3.6 Análise estatística

O teste *t-de student* foi o ensaio estatístico utilizado para determinação de diferenças significativas entre grupos independentes de valores.

Para comparar os dois métodos de monitorização de biofilmes (método do cristal violeta e impedância elétrica), foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA). Foram utilizadas técnicas estatísticas como a correlação e a reta de regressão linear. Em ambos os casos, foi considerada uma distribuição normal com um intervalo de confiança de 95 %, refletindo um nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05. As diferenças foram estatisticamente significativas para valores de  $p < 0,05$  (\*).





## 4 Resultados e discussão

A análise microbiológica da água ornamental em estudo é crucial para a avaliação da sua qualidade e dos riscos para a saúde humana. Assim, este capítulo é focado na caracterização das espécies bacterianas presentes, bem como na sua capacidade de formação de biofilmes *in vitro*.

### 4.1 Caracterização dos isolados identificados

#### 4.1.1 Crescimento bacteriano a diferentes temperaturas

A temperatura ótima de crescimento de um microrganismo é aquela onde se observa um crescimento mais rápido. Nestas condições, a bactéria tem a capacidade de expressar o seu máximo metabolismo <sup>(156, 157)</sup>.

O crescimento bacteriano foi determinado a 5, 25, 37 e 45 °C, com o objetivo de ser avaliada a presença/ausência de UFC em cada condição. Foi observado crescimento bacteriano para todas as temperaturas referidas, exceto 45 °C, para as espécies do género *Aeromonas*. No entanto, a 25 e a 37 °C, embora o ensaio não fosse quantitativo, o número de UFC presentes foi visivelmente superior, refletindo uma cinética de crescimento superior. Nas temperaturas extremas (5 e 45 °C), embora tenham sido detetadas UFC na maioria dos isolados, o seu número foi sempre inferior, sugerindo que estas não constituem temperaturas ótimas.

Estes resultados sugerem que as bactérias estudadas são mesófilas, ou seja, são maioritariamente microrganismos capazes de sobreviver entre 20 e 45 °C, com crescimento ótimo entre cerca de 30 e 39 °C <sup>(158)</sup>. Uma vez que se trata de isolados ambientais, é expectável que se registre um crescimento acelerado à temperatura ambiente. O facto de crescerem a 37 °C constitui um risco para o Homem, sendo que esta é a temperatura do corpo humano.

Os resultados obtidos neste estudo estão, maioritariamente, de acordo com o descrito na literatura (tabela 4.1).

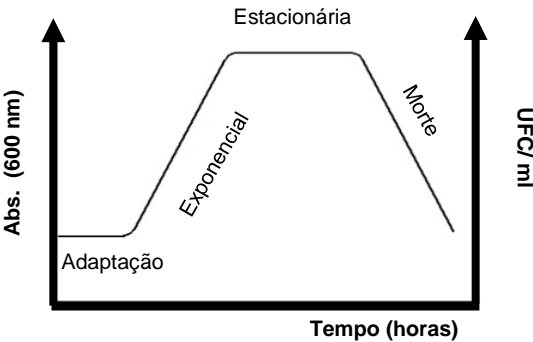
**Tabela 4.1 - Temperaturas de crescimento das espécies.**

		Estirpes bacterianas			
		<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Temperaturas	Toleráveis	7,5 °C – 49 °C <sup>(159)</sup>	4 °C – 42 °C <sup>(161)</sup>	4 °C – 41 °C <sup>(74, 165)</sup>	10 °C – 46 °C <sup>(166)</sup>
	Ótimas	37 °C <sup>(160)</sup>	<i>P. aeruginosa</i> 37 °C <sup>(162)</sup> Outras <i>Pseudomonas</i> spp. 28 °C – 30 °C <sup>(163, 164)</sup>	<i>A. hydrophila</i> 35 °C a 37 °C <sup>(66)</sup> Outras <i>Aeromonas</i> spp. 30 °C <sup>(74)</sup>	37 °C <sup>(167)</sup>

Em estudos realizados anteriormente, as temperaturas ótimas de crescimento para as bactérias estudadas estão compreendidas entre 28 e 37 °C <sup>(66, 74, 160, 162-164, 167)</sup>. Todas as espécies bacterianas presentes na tabela 4.1 apresentaram uma gama semelhante de temperaturas toleráveis de crescimento, compreendidas entre 4 e 49 °C <sup>(74, 159, 161, 165, 166)</sup>.

#### 4.1.2 Tempo de geração

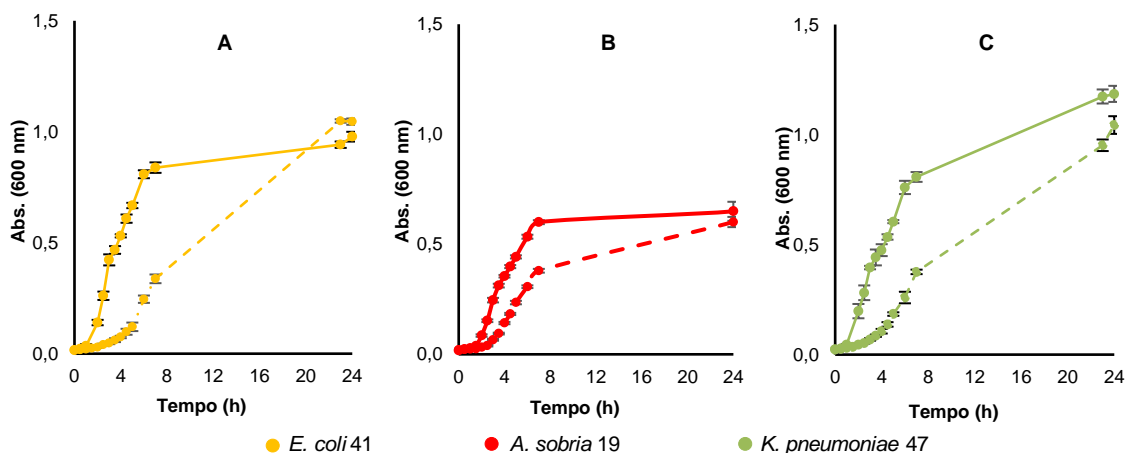
Neste ensaio, foi avaliado o perfil de crescimento dos isolados, bem como o seu tempo de geração. O tempo de geração depende da espécie bacteriana e corresponde ao tempo médio que separa duas divisões celulares consecutivas. Quanto mais rapidamente se divide a população, maior é o número de gerações no mesmo período de tempo e menor é o tempo de geração, o que se reflete num maior número de células bacterianas <sup>(168)</sup>. Como tal, a determinação do tempo de geração pode ser utilizada para selecionar a temperatura ótima de crescimento de uma bactéria. O crescimento da população bacteriana pode ser estudado através da curva de crescimento de uma cultura, presente na figura 4.1.



**Figura 4.1 - Curva de crescimento bacteriano.**

A absorvância a 600 nm pode ser utilizada na monitorização do crescimento bacteriano (UFC), ao longo das diferentes fases de crescimento bacteriano (adaptação, exponencial, estacionária e morte).

Na figura 4.2, são apresentadas curvas de crescimento de isolados de *E. coli*, *A. sobria* e *K. pneumoniae* (*Kp*), a 25 e a 37 °C.



**Figura 4.2 - Perfis de crescimento de *E. coli*, *Aeromonas* spp. e *K. pneumoniae*.**

Perfis de crescimento de *E. coli*, *Aeromonas* spp. e *K. pneumoniae*.

O perfil de crescimento é apresentado para *E. coli* 41 (A), *A. sobria* 19 (B) e *Kp* 47 (C).

O crescimento bacteriano foi monitorizado durante 24 horas, a 25 °C (linha tracejada) e a 37 °C (linha contínua).

A análise das figuras 4.2 A, B e C, permite inferir que as bactérias apresentaram, inicialmente, perfis semelhantes, contudo com cinéticas de crescimento distintas a 25 e 37 °C. Todos os isolados cresceram preferencialmente a 37 °C.

É sugerido, através da observação das curvas de *E. coli* 41 (fig. 4.2 A), *A. sobria* 19 (fig. 4.2 B) e *Kp* 47 (fig. 4.2 C), a 25 °C, que estas apresentaram, até perto das 8 horas, um crescimento exponencial. Ainda que o crescimento abraque a partir desse tempo, possivelmente por uma limitação nutricional, os isolados bacterianos continuaram a crescer ao longo do tempo, não sendo possível a demarcação do início da fase estacionária, fenómeno já verificado noutro estudo, por Anderl e colaboradores <sup>(169)</sup>. Teria sido necessária a monitorização entre as 8 e as 24 horas, ou um prolongamento para além das 24 horas, de maneira a ser confirmado o tempo em que estas bactérias teriam atingido a fase estacionária de crescimento.

A 37 °C, *E. coli* 41 e *A. sobria* 19, presentes nas figuras 4.2 A e B, respetivamente, apresentaram um crescimento exponencial até perto das 8 horas, atingindo posteriormente a fase estacionária, com valores sensivelmente constantes ao longo do tempo. A *Kp* 47 (fig. 4.2 C), igualmente na curva correspondente a 37 °C, cresce a uma cinética elevada até perto das 8 horas e mais lentamente até às 24 horas, com um perfil de crescimento semelhante ao de 25 °C. Contudo, igualmente ao referido anteriormente, teria sido necessário o prolongamento da monitorização.

A comparação entre as curvas de crescimento dos três isolados, *E. coli* 41, *A. sobria* 19 e *Kp* 47, presentes nas figuras 4.2 A, B e C, respetivamente, permite a observação de uma tendência de convergência entre as duas curvas (25 e 37 °C), ao longo do tempo, o que pode dever-se ao facto de, aparentemente, estes isolados apresentarem uma cinética de crescimento semelhante nas duas temperaturas, após a sua adaptação ao ambiente *in vitro*.

Perto das 20 horas, a *E. coli* 41 (fig. 4.2 **A**) foi o único isolado onde essa convergência se verificou, resultando, às 24 horas, num crescimento mais rápido a 25 °C do que a 37 °C. Ainda às 24 horas, a espécie *A. sobria* 19 (fig. 4.2 **B**) apresentou um crescimento semelhante nas duas temperaturas e *Kp* 47 (fig. 4.2 **C**) apresentou um crescimento mais rápido a 37 °C. A monitorização do crescimento bacteriano entre as 8 e as 24 horas, e após as 24 horas de incubação, teria sido relevante para uma determinação mais aproximada do tempo em que existiu a convergência entre as curvas, pelo que, novamente, as deduções apresentadas são meramente especulativas.

No caso das *Pseudomonas* spp., não foi possível identificar um perfil típico, possivelmente devido à existência de três espécies distintas em apenas quatro isolados (*P. aeruginosa*, *P. putida* e *P. oryzihabitans*), pelo que não são apresentados os gráficos referentes a este género bacteriano. A variabilidade de espécies foi refletida nos perfis, tendo existido cinéticas de crescimento distintas entre si.

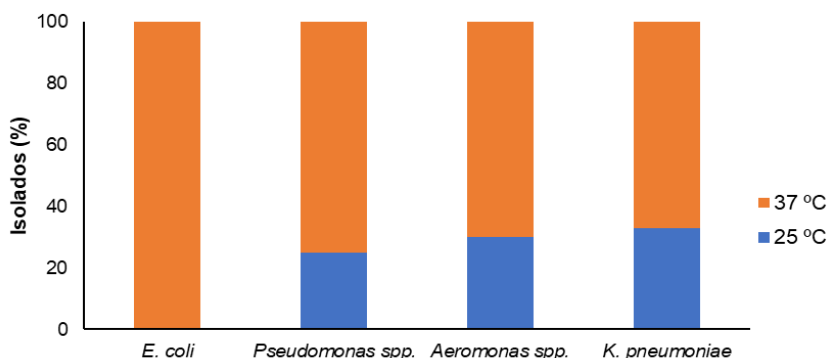
A determinação da fase exponencial do crescimento bacteriano permitiu o cálculo dos tempos de geração dos isolados, cujos valores se encontram na tabela 4.2.

**Tabela 4.2 - Tempos de geração.**

Isolados		Tempo de geração (minutos)	
Espécie	ID	25 °C	37 °C
<i>E. coli</i>	40	91,7	38,8
	41	81,7	33,6
	42	90,4	56,7
	43	106,7	45,9
<i>P. aeruginosa</i>	51	93,9	44,0
<i>P. putida</i>	52	98,7	76,2
	53	175,3	75,6
<i>P. oryzihabitans</i>	57	67,6	112,5
<i>A. veronii</i>	13	79,7	65,4
<i>A. sobria</i>	15	72,8	54,3
	16	62,9	71,4
	19	63,0	33,6
<i>A. hydrophila/caviae</i>	24	62,5	41,3
<i>A. sobria</i>	29	54,6	56,4
	32	67,7	66,3
<i>K. pneumoniae</i>	45	84,4	47,6
	46	60,5	71,6
	47	88,3	65,0
	48	88,8	100,3
	49	82,6	47,1
	50	87,4	53,7

O tempo de geração (G) foi estimado a 25 e a 37 °C. Este parâmetro permitiu definir a temperatura ótima de crescimento, pois, como referido, um menor tempo de geração corresponde a um maior número de células bacterianas.

Uma breve análise da tabela 4.2 permite deduzir que a maioria dos isolados apresentou um G inferior a 37 °C, o que pode ser igualmente observado na figura 4.3.



**Figura 4.3 - Temperatura ótima de crescimento.**

Esta determinação foi realizada para uma amostra total de 21 isolados (n=21). As percentagens foram calculadas para cada género bacteriano: *Escherichia* (n=4), *Pseudomonas* (n=4), *Aeromonas* (n=7) e *Klebsiella* (n=6).

Como é possível observar-se na figura 4.3, de facto, cerca de 67 % dos isolados de *K. pneumoniae*, 71 % de *Aeromonas spp.*, 75 % de *Pseudomonas spp.* e a totalidade das *E. coli*, apresentaram um crescimento ótimo a 37 °C. Apenas cinco isolados (*P. oryzihabitans* 57; *A. sobria* 16 e *A. sobria* 29; *Kp* 46 e *Kp* 48) apresentaram um G inferior a 25 °C.

Dos isolados com crescimento ótimo a 25 °C, *A. sobria* 29 apresentou um menor tempo de geração (54,6 minutos). Em contra-partida, *Kp* 48 foi o que apresentou um maior valor de G (88,8 minutos), a esta temperatura.

Dos isolados com crescimento ótimo a 37 °C, *E. coli* 41 e *A. sobria* 19 foram os que apresentaram um menor G (33,6 minutos), o que sugere uma maior velocidade de duplicação do número de células bacterianas. Pelo contrário, *P. putida* 52 foi o isolado que apresentou um valor de G mais elevado (76,2 minutos).

Os quatro isolados de *E. coli* apresentaram tempos de geração inferiores a 37 °C (n=4, 100 %), estando compreendidos entre 33,6 e 56,7 minutos. Segundo Fossum e colaboradores <sup>(170)</sup>, *E. coli*, em meio rico, regista tempos de geração de 20 minutos. A diferença, entre os valores da literatura e os do ensaio deste estudo, pode dever-se às condições a que os isolados estão sujeitos *in vitro*, pois o facto de subsistirem num meio adaptado às suas necessidades nutricionais conduz a um melhor desempenho.

No género *Pseudomonas spp.*, três isolados apresentaram um crescimento ótimo a 37 °C (3/4, 75 %) e apenas um apresentou um crescimento ótimo a 25 °C (1/4, 25 %). Com foco nas temperaturas ótimas de cada isolado, é observada uma faixa que varia entre 44,0

(*P. aeruginosa* 51) e 76,2 minutos (*P. putida* 52). Os autores LeBauve e Wargo <sup>(171)</sup>, através de ensaios laboratoriais, comprovaram que *P. aeruginosa*, em meio rico, regista tempos de geração entre 25 e 35 minutos, o que pode confirmar os resultados do presente ensaio, ressaltando novamente o facto de que as diferenças entre o descrito na literatura e os resultados destes ensaios se podem dever às condições *in vitro*. Segundo Tricot e colaboradores <sup>(172)</sup>, *P. putida* apresenta um tempo de geração da ordem dos 60 minutos; Para *P. oryzihabitans*, são sugeridos valores de G da ordem dos 155 minutos, em meio com glucose <sup>(173)</sup>, o que difere bastante dos resultados apresentados nestes ensaios. Contudo, os tempos de geração podem variar consoante a fonte de carbono utilizada pelas bactérias.

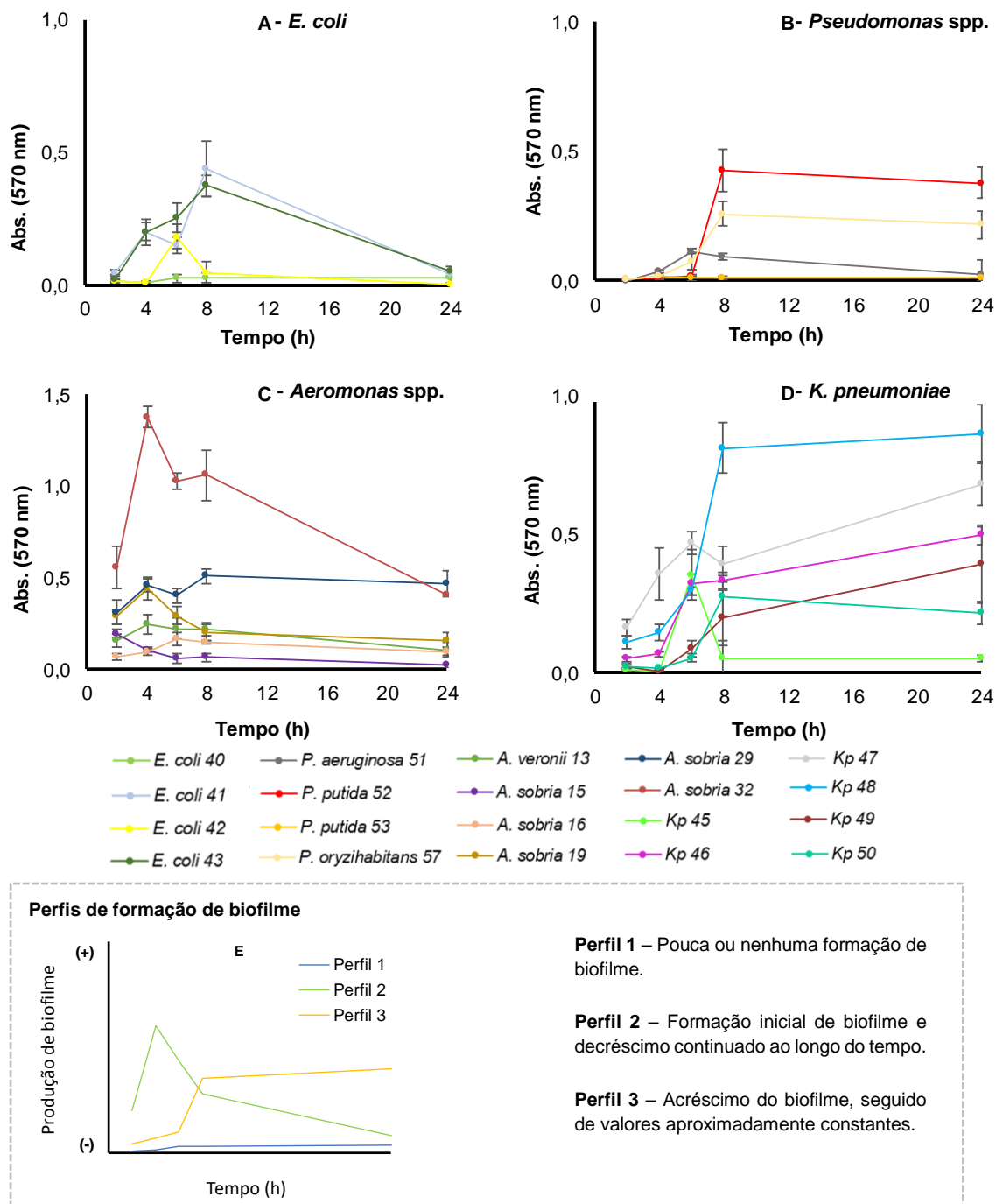
Cinco isolados de *Aeromonas* spp. apresentaram um menor G a 37 °C (5/7, ≈ 71 %) e apenas dois otimizaram o seu crescimento a 25 °C (2/7, ≈ 29 %). Os tempos de geração das espécies do género *Aeromonas* variaram, com foco nas temperaturas ótimas, entre 33,6 (*A. sobria* 19) e 66,3 minutos (*A. sobria* 32). Segundo o descrito na literatura, *A. hydrophila* apresenta tempos de geração da ordem das 0,45 horas (27 minutos) <sup>(174)</sup>, podendo essas diferenças ser novamente justificadas pelas fontes de carbono utilizadas pela bactéria e pelas condições *in vitro*. Os tempos de geração das restantes espécies, *A. sobria* e *A. veronii*, não são registados na literatura, contudo, como referido para *Pseudomonas* spp., o seu valor depende do substrato a que a bactéria cresce <sup>(175)</sup>.

Em *K. pneumoniae*, quatro isolados apresentaram crescimento ótimo a 37 °C (4/6, ≈ 67 %) e apenas dois registaram um menor G a 25 °C (2/6 ≈ 33 %). Nesta espécie, é observada uma faixa de G que varia entre 47,1 (*Kp* 49) e 88,8 minutos (*Kp* 48), segundo as suas temperaturas ótimas. Regué e colaboradores <sup>(176)</sup> realizaram experiências com duas estirpes de *K. pneumoniae* e concluíram que o tempo de geração registado para esta bactéria é de cerca de 40 minutos. Apenas a *Kp* 45 e a *Kp* 49 apresentaram um G aproximado do descrito pelos autores (47,6 e 47,1 minutos, respetivamente). Os restantes quatro isolados apresentaram um G relativamente superior, o que pode dever-se às condições anteriormente referidas para as restantes espécies do estudo.

## 4.2 Biofilmes

### 4.2.1 Biofilmes de uma espécie

O presente ponto do trabalho consistiu na avaliação de produção de biofilme por cada um dos isolados. As cinéticas de formação de biofilme são apresentadas na figura 4.4.



**Figura 4.4 - Cinéticas de formação de biofilmes.**

As cinéticas são apresentadas para isolados de *E. coli* (A), *Pseudomonas* spp. (B), *Aeromonas* spp. (C) e *K. pneumoniae* (D). Os perfis de formação de biofilme estão identificados em (E).

A formação de biofilme foi monitorizada entre as 2 e as 24 horas, a 570 nm.

Inicialmente, foram comparadas as cinéticas de formação de biofilme dentro da mesma espécie (*E. coli* e *K. pneumoniae*, presentes nas figuras 4.4 **A** e **D**, respetivamente) ou género (*Pseudomonas* e *Aeromonas*, presentes nas figuras 4.4 **B** e **C**, respetivamente). Esta análise demonstrou que as cinéticas de formação de biofilme podem ser divididas em 3 perfis-tipo (fig. 4.4 **E**).

No caso dos isolados de *E. coli*, foi possível a observação de duas cinéticas de formação de biofilme (fig. 4.4 **A**). As *E. coli* 41 e 43 demonstraram uma maior formação de biofilme do que os isolados 40 e 42. Para os primeiros, é observado um valor máximo de formação de biofilme às 8 horas, seguido de um decréscimo até às 24 horas. Estes resultados sugerem que às 8 horas existe um biofilme maduro que inicia a sua fase de dispersão. Este perfil é compatível com o perfil 2. Os restantes isolados (*E. coli* 40 e 42) são compatíveis com o perfil 1, uma vez que, ao longo das 24 horas, foram sempre registados valores de absorvância muito baixos (isolados com pouca ou nenhuma capacidade de formação de biofilme).

Relativamente à formação de biofilme das *Pseudomonas* spp. (fig. 4.4 **B**), foram igualmente identificados dois perfis. Num deles, foram incluídas a *P. putida* 52 e a *P. oryzihabitans* 57, que apresentaram alguma capacidade de formação de biofilme, atingindo o seu ponto máximo após 8 horas. Contudo, ao invés do observado para as *E. coli* 41 e 43, não registaram uma queda abrupta até às 24 horas, sugerindo uma dispersão mais lenta do biofilme. Por esta razão, estes dois isolados de *Pseudomonas* foram incluídos no perfil 3. Os restantes, *P. aeruginosa* 51 e *P. putida* 53, registaram cinéticas de formação de biofilme idênticas e concordantes com o perfil 1, evidenciando a fraca produção de biofilme. Este resultado sugere que a formação de biofilme não é condicionada pela espécie a que os isolados pertencem, embora o número de isolados seja reduzido.

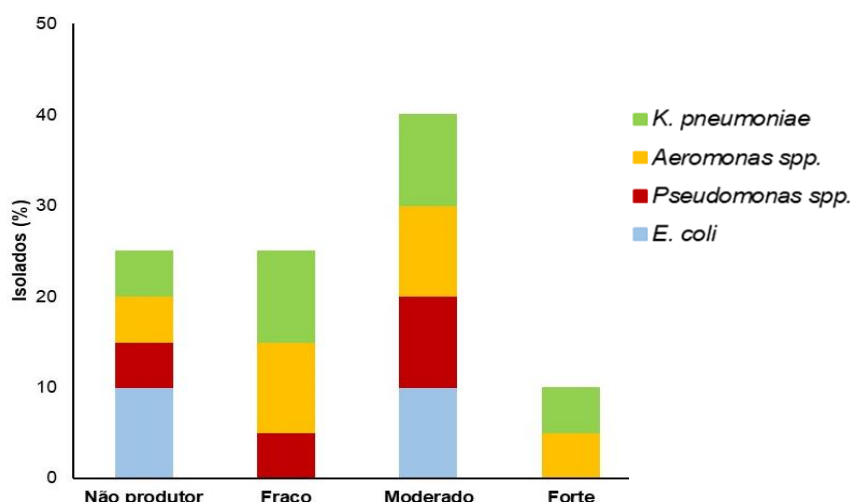
A formação de biofilme pelos isolados de *Aeromonas* (fig. 4.4 **C**) permitiu a distinção de três perfis. *A. sobria* 32 foi o isolado que demonstrou uma maior formação, em comparação com os restantes; para este isolado e para *A. sobria* 19 é observado um rápido crescimento até às 4 horas, onde se sugere a existência de um biofilme maduro e o início da fase de dispersão após esse tempo, com valores quase sempre decrescentes até 24 horas, pelo que foram incluídos no perfil 2. Os isolados de *A. veronii* 13, *A. sobria* 16 e *A. sobria* 29 foram incluídos no perfil 3, onde existiu um crescimento na fase inicial, seguido de valores idênticos ao longo do tempo (a partir das 6 e 8 horas, respetivamente), o que sugere, como referido anteriormente, uma dispersão lenta do biofilme. A curva referente a *A. sobria* 15 sofreu um decréscimo da biomassa do biofilme entre as 2 e as 6 horas, apresentando, na maior parte do tempo pouca formação de biofilme, pelo que foi incluída no perfil 1.

Os isolados de *K. pneumoniae* foram incluídos em dois perfis de formação de biofilme (fig. 4.4 **D**), tal como as *E. coli* e as *Pseudomonas* spp. A *Kp* 48 foi a que apresentou, aparentemente, uma maior cinética de formação de biofilme e foi incluída, tal como as *Kp* 46, 47, 48, 49 e 50, no perfil 3, onde é sugerida a existência de um biofilme maduro às 6 horas (*Kp* 46 e 47) e às 8 horas



(Kp 48, 49 e 50), seguido de uma dispersão lenta até às 24 horas. A Kp 45 apresentou pouca capacidade de formação de biofilme, tendo sido incluída no perfil 1.

Para facilitar a interpretação dos resultados, os isolados foram classificados como apresentado na tabela 3.2, sendo: não produtor, produtor fraco, produtor moderado e forte produtor de biofilme <sup>(154)</sup>. A figura 4.5 apresenta a classificação, bem como as respetivas percentagens por categoria.



**Figura 4.5 - Formação de biofilmes *in vitro*.**

A capacidade de formação de biofilme por 20 isolados bacterianos (n=20), incluindo *E. coli* (n=4), *Pseudomonas spp.* (n=4), *Aeromonas spp.* (n=6) e *K. pneumoniae* (n=6), foi avaliada pelo ensaio de cristal violeta. Os isolados foram classificados em quatro categorias quanto à sua capacidade de formação de biofilme, sendo os resultados expressos em percentagem, calculada em relação ao total de isolados da amostra.

A figura 4.5 permite afirmar que um quarto dos isolados (25 %) foi classificado como não produtor e outro quarto como produtor fraco de biofilme, 40 % são produtores moderados e apenas 10 % apresentaram uma forte produção de biofilme.

Isolados de todos os géneros bacterianos foram classificados como não produtores ou produtores moderados de biofilmes. Na categoria dos não produtores, a *E. coli* contribuiu com 10 % (dois isolados: *E. coli* 40 e 42) e os restantes géneros bacterianos com 5 % cada, correspondendo aos seguintes isolados: *P. putida* 53, *A. sobria* 15 e Kp 45. Na categoria dos produtores moderados, onde foi classificada a maioria dos isolados, curiosamente cada um dos géneros bacterianos contribuiu com dois isolados (10 % cada): *E. coli* 41 e 43; *P. putida* 52 e *P. oryzae* 57; *A. sobria* 19 e 29 e Kp 46 e 47.

Na categoria de fraco produtor de biofilme não estão representados isolados de *E. coli*. O género *Pseudomonas* contribuiu com 5 % dos isolados (*P. aeruginosa* 51) enquanto as *Aeromonas* (*A. sobria* 13 e 16) e as *Klebsiella* (Kp 49 e 50) contribuíram com 10 % cada. Dois isolados (*A. sobria* 32 e Kp 48) foram classificados como fortes produtores de biofilme (10 %).

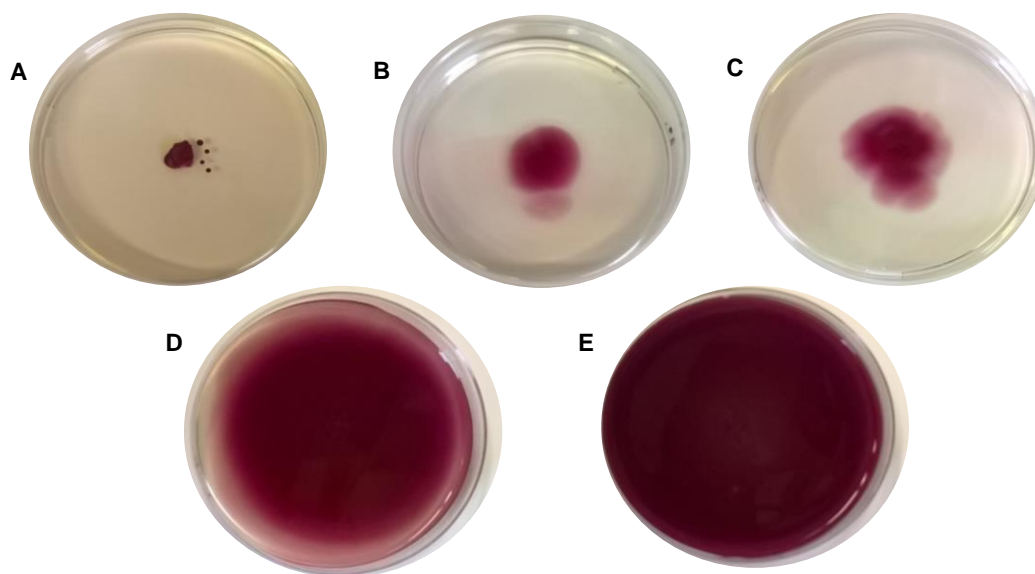
Apenas os dois géneros bacterianos *Aeromonas* e *Klebsiella*, que curiosamente são os mais representados na amostra, contribuíram para todas as categorias. No caso das *Aeromonas*, tal poderá ser atribuído a variações entre as espécies, uma vez que existem isolados de *A. veronii* e de *A. sobria*. Contudo, para *Klebsiella* existem apenas isolados representantes de uma espécie: *K. pneumoniae*, o que sugere a existência de características específicas em cada isolado, que condicionam a sua capacidade de formação de biofilme. Este resultado está de acordo com o descrito para *K. pneumoniae* de origem clínica <sup>(98, 177)</sup>.

Existiu, ainda, a tentativa de relacionar a capacidade de formação de biofilme pelas bactérias (*in vitro*) e a sua origem no ambiente (água ou biofilme), não tendo sido verificado que bactérias isoladas de biofilmes ambientais apresentaram maior capacidade para formar biofilmes *in vitro*. Curiosamente, os isolados classificados como fortes produtores de biofilmes foram ambos recuperados de amostras de água. Entre as bactérias consideradas não produtoras (n=5), são encontrados, maioritariamente, isolados de biofilmes ambientais (3/5) e todas as bactérias classificadas como fracas produtoras de biofilmes foram recuperadas, igualmente, de biofilmes (n=5). Este resultado, aparentemente contraditório, poderá ser explicado, pelo menos parcialmente, pelo facto de as condições *in vitro* não mimetizarem exatamente as condições ambientais. Neste caso, o meio de cultura, a superfície onde o biofilme se forma e a ausência de fluxo no sistema *in vitro* podem influenciar o resultado observado. Foi comprovado, anteriormente, que a superfície de cimento, existente no lago ornamental em estudo, promoveu uma melhor formação de biofilme pelas bactérias, do que uma outra superfície testada (vidro) <sup>(178)</sup>. Este problema não é exclusivo destes estudos, tendo sido igualmente relatado por outros autores <sup>(179-181)</sup>, e, por esta razão, um dos desafios que é, atualmente, colocado à comunidade científica é o estabelecimento e validação de protocolos para o estudo de biofilmes <sup>(182, 183)</sup>.

#### 4.2.1.1 Deslizamento em meio semi-sólido *versus* capacidade de formação de biofilme

O deslizamento em meio semi-sólido é definido como um movimento bacteriano, acionado por flagelos rotativos, que facilita a disseminação de colônias <sup>(184-186)</sup>. As bactérias deslizantes formam diversos padrões de colônias macroscópicas em meio sólido <sup>(187-190)</sup>.

Este ensaio foi realizado com o objetivo de se estabelecer uma relação entre o deslizamento das bactérias e a sua capacidade de formação de biofilme. A figura 4.6 apresenta o padrão de deslizamento de algumas das bactérias, a 37 °C.



**Figura 4.6 - Deslizamento em meio semi-sólido.**

O deslizamento é apresentado para *K. pneumoniae* 50 (A), *A. sobria* 29 (B), *A. sobria* 32 (C), *E. coli* 43 (D) e *K. pneumoniae* 47 (E), a 37 °C.

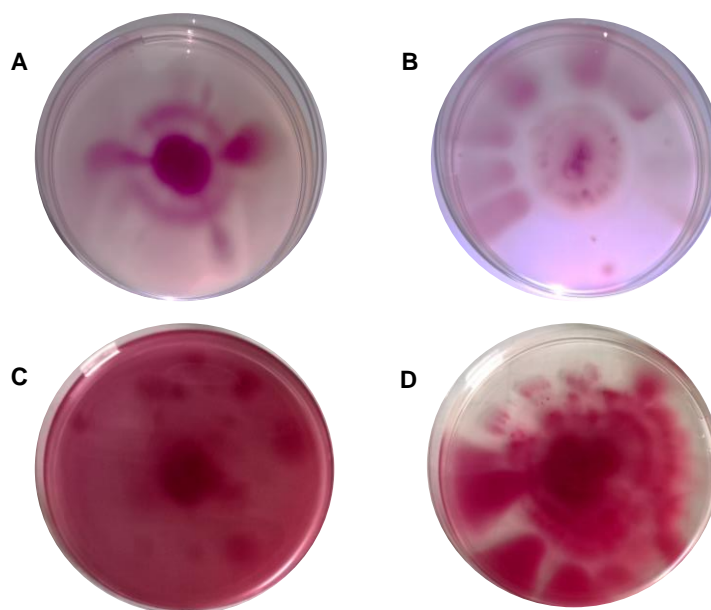
O deslizamento de *Kp* 50 (fig. 4.6 A) demonstra uma fraca capacidade deste isolado, que formou uma colônia confinada no centro da placa, ao contrário de *Kp* 47 (fig. 4.6 E), que colonizou a totalidade da placa, nas mesmas condições. Carabarin-Lima e colaboradores <sup>(191)</sup> demonstraram que várias estirpes de *K. pneumoniae* podem apresentar deslizamentos variáveis entre si, dependendo das suas características genotípicas e fenotípicas, o que pode justificar os resultados apresentados.

Os isolados de *A. sobria*, 29 e 32 (figs 4.6 B e C, respetivamente), apresentaram um padrão de colonização irregular, sugerindo uma maior concentração bacteriana no centro da placa, fenómeno igualmente verificado por outros autores <sup>(192)</sup>.

O isolado de *E. coli*, 43 (fig. 4.6 D), revelou capacidade de deslizamento, colonizando quase a totalidade da placa, num movimento homogêneo não padronizado. Swiecicki e colaboradores <sup>(193)</sup> definiram o deslizamento desta espécie como semelhante ao da figura, o que sugere uma concordância com o descrito na literatura.

Kearns <sup>(194)</sup> comprovou que células incapazes de deslizarem e de se espalhar pela superfície, crescem como uma colônia confinada no centro da placa, como o apresentado nas figuras 4.6 **A**, **B** e **C**. Outros autores verificaram que, pelo contrário, bactérias deslizantes migram rapidamente para longe do ponto de inoculação (fenômeno presente nas figuras 4.6 **D** e **E**), afirmando que o comportamento do deslizamento é quimiotaticamente orientado <sup>(195-197)</sup>.

Como observado na figura 4.6, a 37 °C, a maioria dos isolados apresentou um padrão centrífugo e uniforme, exceto *A. sobria* 29 e *A. sobria* 32. A figura 4.7 expõe padrões heterogêneos de deslizamento observados em alguns isolados.



**Figura 4.7 - Deslizamento em meio semi-sólido: padrões heterogêneos.**

O deslizamento é apresentado para *A. veronii* 13 (**A**), *A. hydrophila/caviae* 24 (**B**), *A. sobria* 16 (**C**) e *A. sobria* 32 (**D**), a 25 °C, após cinco dias de incubação.

Curiosamente, através da análise das figuras 4.7 **A**, **B**, **C** e **D**, são observados apenas padrões de deslizamento por *Aeromonas* spp., o que indica que este gênero bacteriano pode apresentar padrões bastante heterogêneos e distintos entre si.

É afirmado, por alguns autores, que o significado do padrão em particular não é claro, ainda que dependa das condições ambientais <sup>(187-190)</sup>.

As distâncias de deslizamento são apresentadas no anexo I, tabela I.1.

Com base na distância percorrida, os isolados foram ordenados quanto à sua capacidade para deslizar no meio semi-sólido. De seguida, foi estudada a relação entre a capacidade de deslizamento e a de formação de biofilme, a 37 °C (tabela 4.3).

Isolados		Biofilme	Deslizamento
Espécie	ID		
<i>E. coli</i>	41		
	42		
	43		
<i>P. aeruginosa</i>	51		
<i>P. putida</i>	52		
	53		
<i>P. oryzae</i>	57		
<i>A. veronii</i>	13		
<i>A. sobria</i>	15		
	16		
	19		
	29		
	32		
<i>K. pneumoniae</i>	45		
	46		
	47		
	48		
	49		
	50		

A ordem apresentada na tabela 4.3 sugere a existência de uma relação direta entre a formação de biofilme e o deslizamento para todos os isolados de *E. coli*, pelo que uma maior capacidade de formação de biofilme correspondeu a um maior deslizamento, e vice-versa. Wood e colaboradores <sup>(198)</sup> também verificaram o fenômeno descrito.

Relativamente aos isolados de *Aeromonas* spp. e *K. pneumoniae*, não foi verificada uma relação direta entre os dois parâmetros e não é correto ser afirmado que se manteve uma relação inversa, pois existiu variabilidade entre isolados da mesma espécie. As *A. sobria* 16 e 32, aparentemente demonstraram uma relação inversa e *A. veronii* 13 e as *A. sobria* 15, 19 e 29 uma relação direta, tal como as *Kp* 45, 48 e 50 (relação inversa) e as *Kp* 46, 47 e 49 (relação direta).

Os flagelos laterais de *Aeromonas*, além de serem responsáveis pelo seu deslizamento e permitirem a migração das bactérias sobre as superfícies por movimentos rotativos, contribuem para a formação do biofilme <sup>(150, 184, 192)</sup>, o que permite sugerir a existência de uma relação direta entre a capacidade de formação de biofilme e o movimento de deslizamento deste género bacteriano, quando as proteínas relacionadas com os flagelos se expressam de forma idêntica <sup>(150, 184, 192)</sup>, o que pode justificar, novamente, os resultados apresentados nestes ensaios.

É comprovado, na literatura, que *K. pneumoniae* apresenta flagelos sob certas condições, permitindo assim o deslizamento bacteriano. A expressão de proteínas relacionadas com os flagelos também pode estar ligada a outros mecanismos, como a formação de biofilme <sup>(191)</sup>. Tal como em *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp., não tendo sido confirmada a presença ou ausência de flagelos, não são possíveis conclusões acerca do tema.

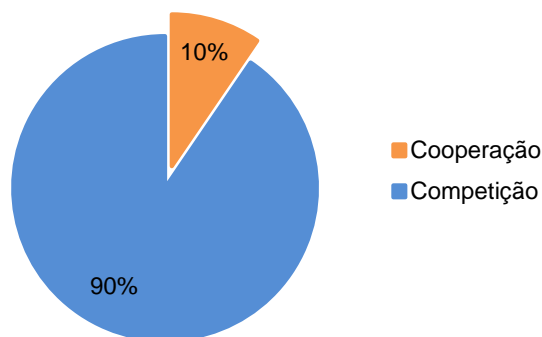
#### 4.2.2 Biofilmes binários

##### 4.2.2.1 Isolados bacterianos co-existent

Nesta parte do estudo, foram avaliados biofilmes binários. As interações entre espécies foram analisadas em dois pontos relacionados com duas fases importantes da formação dos biofilmes: a aderência (2 horas) e a maturação (8 horas).

Foram estudados os biofilmes binários *in vitro*, por serem os consórcios mais facilmente compreendidos. Neste estudo preliminar, foram testadas misturas binárias de bactérias isoladas no mesmo mês e que, portanto, co-existem no ambiente. Os meses de colheita do estudo anteriormente referido <sup>(149)</sup> foram selecionados de forma a existir, para além do género bacteriano residente (*Aeromonas* spp.), pelo menos uma das bactérias indicadoras da qualidade da água: *E. coli*, *K. pneumoniae* ou *Pseudomonas* spp. Este desenho experimental originou 24 binómios bacterianos (n=24), que foram testados quanto à capacidade de formação de biofilme e às interações entre os dois membros do consórcio bacteriano.

Dessas 24 misturas binárias, em 21 foi observado o mesmo tipo de interação nos dois pontos horários associados às duas fases da formação de biofilme e as percentagens associadas a cada interação são apresentadas na figura 4.8.



**Figura 4.8 - Biofilmes binários: Relações entre espécies.**

As interações foram determinadas para uma amostra total de 21 misturas binárias (n=21) e classificadas de acordo com Foster e Bell <sup>(114)</sup>.

A observação da figura 4.8 permite afirmar que, para 90 % dos binómios (19/21) foi observada uma relação de competição entre as espécies e 10 % (2/21) correspondeu a uma cooperação.

Para os restantes binómios (n=3) foram identificadas relações distintas nas fases de aderência e de maturação do biofilme. Em dois dos binómios, existiu uma cooperação entre as espécies às 2 horas e uma competição às 8 horas; no outro sucedeu o inverso, tendo existido uma relação de competição e cooperação às 2 e às 8 horas, respetivamente.

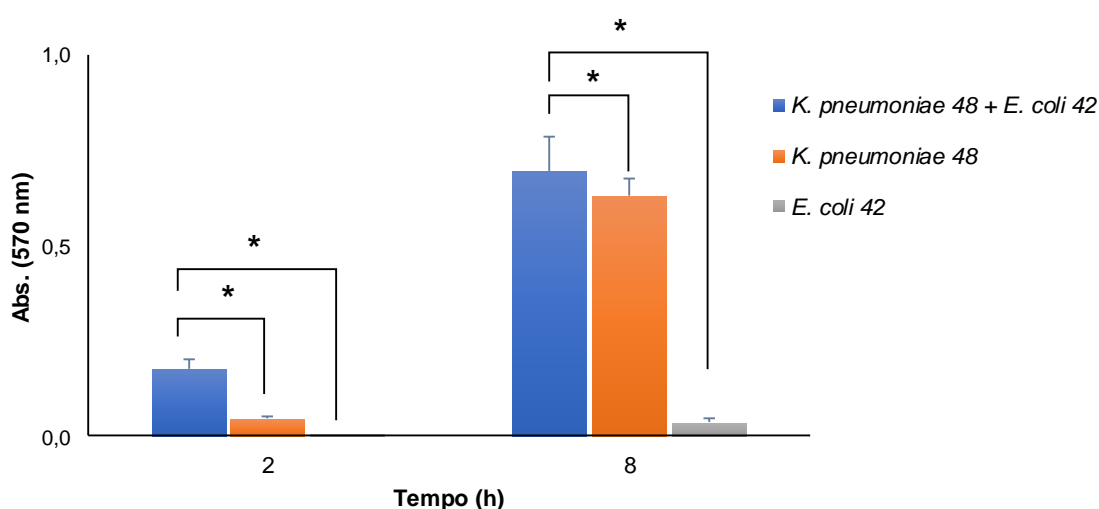
Este assunto ainda não é consensual na comunidade científica, pelo que existem relatos contraditórios. Elias e Banin <sup>(205)</sup> sugeriram que a onnipresença dos biofilmes polimicrobianos em ambientes ecológicos e clínicos, deveria promover as interações de cooperação entre as espécies, ao invés de interações de competição, particularmente as sinergias que facilitam a co-existência. Contudo, Foster e Bell <sup>(114)</sup>, embora assumam a existência da interação anteriormente descrita em alguns casos, descreveram o fenómeno inverso. Os seus resultados experimentais sugeriram que a competição é a interação dominante entre espécies microbianas que co-habitam no ambiente. Os trabalhos realizados por Hibbing e colaboradores estão igualmente de acordo com esta última perspetiva <sup>(206)</sup>.

Um dos fatores que é, muitas vezes, apontado como responsável pela competição observada nas experiências laboratoriais são as espécies utilizadas, que normalmente não partilham o mesmo habitat <sup>(114)</sup>. No presente estudo, este fator foi eliminado, pois apenas foram testadas espécies co-existent no ambiente. Os resultados obtidos podem ser justificados pelas condições utilizadas no ensaio *in vitro* serem distintas das que existem no ambiente. Por exemplo, durante todo o estudo existiu, no lago, um biofilme de *Aeromonas*, ao qual se associavam outras espécies ao longo do tempo <sup>(149)</sup>. No entanto, nas condições experimentais

do presente trabalho, foi testada a formação de biofilme, simultaneamente por várias combinações de bactérias.

A força das competições e cooperações bacterianas pode estar no seu potencial de co-adaptação a longo prazo e no grau de sobreposição do nicho ecológico <sup>(207)</sup>. Assumindo que a formação de biofilmes ambientais se assemelha ao que ocorre na cavidade oral, é inferido que possam existir bactérias com uma localização específica dentro do biofilme, e, por isso, com funções distintas na sua formação <sup>(208)</sup>.

De seguida, são apresentados dois exemplos de misturas binárias, onde foram observadas diferentes interações entre as espécies do consórcio. O primeiro consiste numa cooperação entre uma *Kp* e uma *E. coli*, apresentada na figura 4.9.



**Figura 4.9 - Cooperação entre espécies.**

A formação de biofilme por isolados de *Kp* 48 e *E. coli* 42 e pela sua mistura binária foi avaliada após 2 e 8 horas de incubação a 37 °C. A diferença foi considerada significativa para valores de  $p < 0,05$  (\*).

Como é observado na figura 4.9, ao fim de 2 e de 8 horas a soma da biomassa das duas nulas (bactérias isoladas) foi inferior à biomassa presente no biofilme. Neste caso, os dois isolados apresentaram capacidades distintas de formação de biofilme, tendo *Kp* 48 sido classificada como forte produtora de biofilme e *E. coli* 42 como não produtora, o que pode justificar a existência de uma cooperação entre estes isolados.

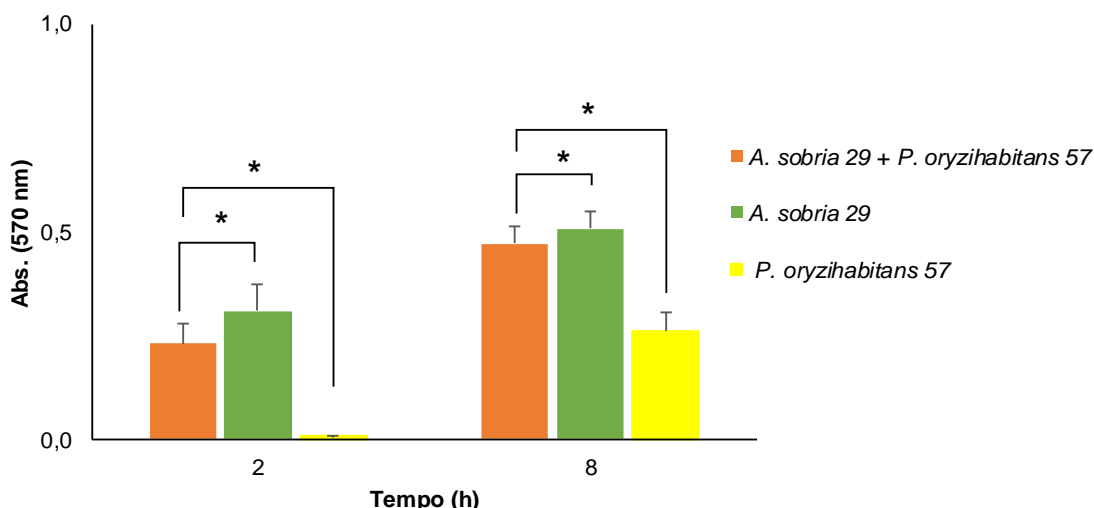
Aparentemente, *Kp* 48 foi o isolado que deve ter contribuído mais para a biomassa do biofilme, pelo que a biomassa do biofilme binário se assemelhou à da nula (às 8 horas) e foi muito superior à de *E. coli* 42, que aparentemente foi o isolado mais beneficiado neste consórcio. Uma vez que não foram realizados ensaios quantitativos de determinação das contribuições exatas de cada um dos isolados para a biomassa do biofilme, estas conclusões são meramente especulativas.

Uma justificação para a observação da relação sinérgica entre estes dois isolados pode ser o facto de pertencerem ao grupo bacteriano ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies



de *Enterobacter*), que constitui, no Homem, a principal causa de infeções associadas aos cuidados de saúde, e contém bactérias frequentemente isoladas do mesmo nicho ecológico<sup>(209-211)</sup>. Curiosamente, além deste binómio, existiu outro onde aparentemente se verificou uma sinergia entre as espécies, que incluiu, igualmente, isolados do mesmo grupo: *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, o que pode importar na validação dos resultados apresentados.

Na figura 4.10, é apresentado um exemplo da interação mais frequentemente observada na amostra de binómios estudada.



**Figura 4.10 - Competição entre espécies.**

A formação de biofilme por isolados de *A. sobria* 29 e *P. oryzae* 57 e pela sua mistura binária foi avaliada após 2 e 8 horas de incubação a 37 °C. A diferença foi considerada significativa para valores de  $p < 0,05$  (\*).

Como é observado na figura 4.10, ao fim de 2 e de 8 horas a soma da biomassa das duas nulas foi superior à biomassa presente no biofilme binário. Neste caso, existiu uma competição em isolados classificados na mesma categoria de formação de biofilme (produtores moderados).

Aparentemente, a *A. sobria* 29 foi a espécie que mais contribuiu para a biomassa do biofilme, sendo notada uma maior diferença entre os dois isolados, às 2 horas. Contudo, às 8 horas, é observado um aumento significativo da biomassa de *P. oryzae* 57. Ainda assim, esta última espécie, aparentemente, foi a mais beneficiada no consórcio, pois a sua biomassa foi, nos dois tempos, inferior à biomassa do biofilme. Novamente, as conclusões são meramente especulativas, contudo, o facto de, no estudo de onde surgiram estes isolados, *Aeromonas* spp. ter sido uma presença constante no biofilme e *P. oryzae* 57 ter sido um membro isolado apenas num mês (esporádico), pode validar os resultados apresentados.

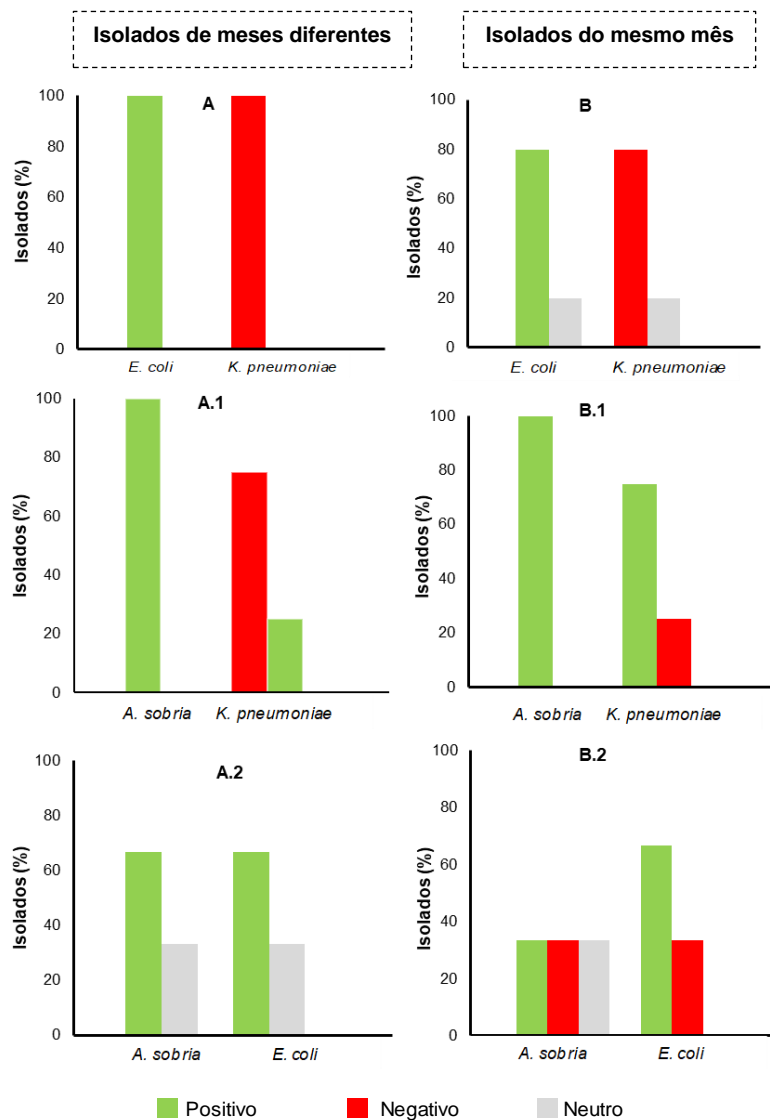
Gabrilska & Rumbaugh<sup>(180)</sup> descreveram, além disso, que, muito frequentemente, uma co-cultura *in vitro*, pode resultar na morte de uma ou mais espécies, mesmo co-existindo de forma estável no ambiente natural. Tal pode ser justificado pelas condições artificiais (*in vitro*) a que as mesmas foram sujeitas.

Foram testadas as misturas binárias entre *Aeromonas* spp. e um isolado de um gênero distinto, e foi sempre registada uma relação de competição. Foi comprovada, na literatura, a produção de bacteriocinas por isolados bacterianos, incluindo *Aeromonas* spp., e, além disso, foi também demonstrada a inibição da biomassa de espécies co-existentes no biofilme, o que poderá suportar os resultados descritos <sup>(212-214)</sup>.

Após os ensaios que incluíram consórcios binários, foram avaliados todos os consórcios possíveis dentro de cada mês, sendo 4 consórcios com três membros e 1 com cinco membros. No entanto, nestes foi corroborada a complexidade e a dificuldade na interpretação das interações entre os diferentes membros, pelo que não foram incluídos nos resultados.

#### 4.2.2.2 Isolados bacterianos co-existent *versus* isolados de meses diferentes

Como a análise dos resultados obtidos com consórcios com mais do que duas espécies se revelou, como referido, muito complexa, foi aprofundado o estudo acerca das misturas binárias, onde se compararam bactérias isoladas do mesmo mês com bactérias isoladas em meses diferentes, ou seja, a co-existência no mesmo habitat e a existência no habitat em tempos distintos. Para facilitar a interpretação dos resultados, foi comparada a biomassa do biofilme de cada uma das bactérias com o biofilme formado pelas duas espécies (n=12 misturas por condição) e os resultados estão presentes na figura 4.11.



**Figura 4.11 - Biomassa em biofilmes: Isolados de meses diferentes versus Isolados do mesmo mês.**

A biomassa dos isolados com a dos biofilmes binários foi comparada, para um total de 24 misturas binárias (n=24), onde: *E. coli* + *K. pneumoniae* (**A** e **B**; n=10), *A. sobria* + *K. pneumoniae* (**A.1** e **B.1**; n=8) e *A. sobria* + *E. coli* (**A.2** e **B.2**; n=6), às 24 horas.

Os isolados foram colhidos em meses diferentes (**A**, **A.1** e **A.2**) e no mesmo mês de colheita (**B**, **B.1** e **B.2**).

A primeira coluna de cada gráfico consiste na variação predominante.

A análise das figuras 4.11 **A** e **B**, sugere, no biofilme de *E. coli* com *Kp*, um acréscimo da biomassa de *E. coli* e um decréscimo da biomassa de *Kp*, em comparação com a biomassa do consórcio; independentemente da co-existência no ambiente. Apenas 20 % (uma mistura) dos consórcios de *E. coli* e *Kp* (de isolados provenientes do mesmo mês de colheita, fig. 4.11 **B**) apresentaram aproximadamente a mesma biomassa do que o consórcio. É notado, ainda na figura 4.11 **B**, que, embora tivesse existido um decréscimo da biomassa de *Kp* do mesmo mês (80 % das misturas), em comparação com a biomassa da mistura, esse decréscimo não foi tão elevado como em isolados provenientes de meses diferentes de colheita (100 % das misturas, fig. 4.11 **A**).

Os consórcios de *A. sobria* com *Kp*, apresentados nas figuras 4.11 **A.1** e **B.1**, sugerem um aumento da biomassa de *A. sobria* (em 100 % das misturas), quando comparada com a biomassa da mistura. Entre os isolados de *Kp*, é verificado o inverso do fenómeno quando os isolados provêm do mesmo mês de colheita, existindo um aumento da biomassa de isolados que co-existem no habitat (fig. 4.11 **B.1**) e um decréscimo quando estes provêm de meses diferentes de colheita (fig. 4.11 **A.1**) (75 % das misturas nas duas condições). Apenas 25 % dos consórcios apresentaram um aumento da biomassa de *Kp*, em isolados de meses diferentes e um decréscimo de *Kp* no mesmo mês de colheita.

Por último, em consórcios de *A. sobria* e *E. coli*, apresentados nas figuras 4.11 **A.2** e **B.2**, foram sempre verificados acréscimos na sua biomassa em relação à mistura, ainda que em percentagens distintas. Quando essas espécies co-existiram no ambiente (fig. 4.11 **B.2**), o acréscimo da biomassa de *A. sobria* existiu em apenas 33,3 % dos consórcios, tal como o decréscimo e a ausência de variação. Em isolados de meses diferentes de colheita (fig. 4.11 **A.2**), houve um acréscimo da biomassa das duas espécies em 67,7 % dos consórcios. Os restantes 33,3 % representam a ausência de diferenças significativas entre a sua biomassa e a do consórcio. Neste caso, os resultados não foram consensuais, o que pode dever-se ao número de amostras analisadas em cada condição (n=3).

Na maioria dos consórcios estudados, é notado que o decréscimo da biomassa do biofilme foi menor em bactérias do mesmo mês de colheita, o que sugere uma maior adaptação entre bactérias que co-existem no mesmo habitat. Como não são conhecidas as contribuições de cada um dos isolados no biofilme, não é possível concluir qual o que predomina na sua biomassa, pelo que, novamente, apenas são possíveis especulações acerca do tema.

Encontra-se descrito que bactérias provenientes do mesmo ecossistema (co-existent), *in vitro* podem ampliar as relações de cooperação entre si, promovendo um aumento da biomassa do seu biofilme <sup>(207, 112)</sup>. No caso do presente ensaio, as amostras de água provêm da mesma natureza, contudo de períodos diferentes (figs 4.11 **A**, **A.1** e **A.2**), o que pode favorecer as relações de competição entre as espécies consorciadas, conduzindo à redução da biomassa do biofilme. Este fenómeno foi anteriormente sugerido por Madsen e colaboradores <sup>(215)</sup>, que co-

cultivaram aleatoriamente bactérias presentes em diferentes biofilmes, no mesmo período de tempo.

#### 4.2.2.3 Efeito de *Aeromonas* spp. em biofilmes de *K. pneumoniae*


##### Método convencional

Nesta parte do trabalho, foi avaliado o efeito de *Aeromonas* spp. (bact.), ou dos seus sobrenadantes (sobren.), em biofilmes maduros de *K. pneumoniae* (biofilmes com 8 horas).

Todos os isolados de *Kp* (n=6) foram incluídos no estudo. No caso das *Aeromonas*, foram selecionados os isolados segundo os seguintes critérios: pertencer à espécie predominantemente isolada do lago ornamental (*A. sobria*) ou à espécie responsável pela maioria de infeções no Homem (*A. hydrophila*). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 4.4.

**Tabela 4.4 - Efeito de *Aeromonas* spp. em biofilmes de *K. pneumoniae*.**

Efeito no biofilme de <i>Kp</i>		<i>Kp</i> 45	<i>Kp</i> 46	<i>Kp</i> 47	<i>Kp</i> 48	<i>Kp</i> 49	<i>Kp</i> 50	Tempo (h)
Espécie Adicionada	Bact.							
	Sobren.							
<i>A. sobria</i> 16	Bact.							24
	Sobren.							
	Bact.							48
	Sobren.							
	Bact.							72
	Sobren.							
<i>A. hydrophila</i> 24	Bact.							24
	Sobren.							
	Bact.							48
	Sobren.							
	Bact.							72
	Sobren.							

 Positivo para *Kp*;  
 Negativo para *Kp*;  
 Neutro (sobrenadante) para *Kp*;  
 Neutro (bactéria) para *Kp*.

Bact. – bactéria  
 Sobren. - Sobrenadante

A tabela 4.4 mostra que as duas espécies de *Aeromonas*, *A. sobria* 16 e *A. hydrophila* 24 interagem de forma distinta com os isolados de *Kp*. É, ainda, importante registar que o efeito de *Aeromonas* e do seu sobrenadante sobre o biofilme de *Kp* pode, ou não, ser distinto.

Numa análise mais detalhada, é observado que *A. sobria* 16 só interferiu com o biofilme de *Kp* ao fim de 48 horas. Neste ponto, é verificado um aumento da biomassa do biofilme de *Kp* 45, quando co-cultivado com isolados de *Aeromonas* ou do seu sobrenadante. O efeito contrário é observado para *Kp* 49, na presença de *A. sobria* 16, mas não do seu sobrenadante. Decorridas

72 horas, a biomassa do biofilme de todas as *Kp*, exceto *Kp* 49, decresceu na presença do sobrenadante de *A. sobria* 16, mas não da própria bactéria.

*A. hydrophila* 24, ou o seu sobrenadante, promoveu mais variações significativas com os biofilmes de *Kp* do que *A. sobria* 16. A biomassa dos biofilmes de três *Kp* (46, 48 e 50) aumentou significativamente na presença do sobrenadante de *A. hydrophila* 24, ao fim de 24 horas. Este efeito é igualmente observado para o biofilme de *Kp* 46, na presença da *Aeromonas*, não apenas às 24 como também às 48 horas. Às 48 horas, é verificado que, além de *Kp* 46, a biomassa do biofilme das *Kp* 45 e 50 aumenta na presença de *A. hydrophila*. O mesmo efeito é observado nos biofilmes de *Kp* 45 e *Kp* 50, na presença do sobrenadante da *Aeromonas*. Contudo, o efeito do sobrenadante de *A. hydrophila* variou, aparentemente, com a *Kp*, sendo observado um decréscimo da biomassa do biofilme de *Kp* 47 e 49. Importa ainda referir que as duas espécies de *Aeromonas* e respetivos sobrenadantes têm o mesmo efeito sobre *Kp* 45, às 48 horas. O efeito do sobrenadante de *A. hydrophila* ao fim de 72 horas, sobre a biomassa do biofilme de *Kp* 45, 46, 47 e 50 (decréscimo da biomassa) é semelhante ao observado para *A. sobria*, contudo, *A. hydrophila* promove o aumento da biomassa do biofilme de *Kp* 45.

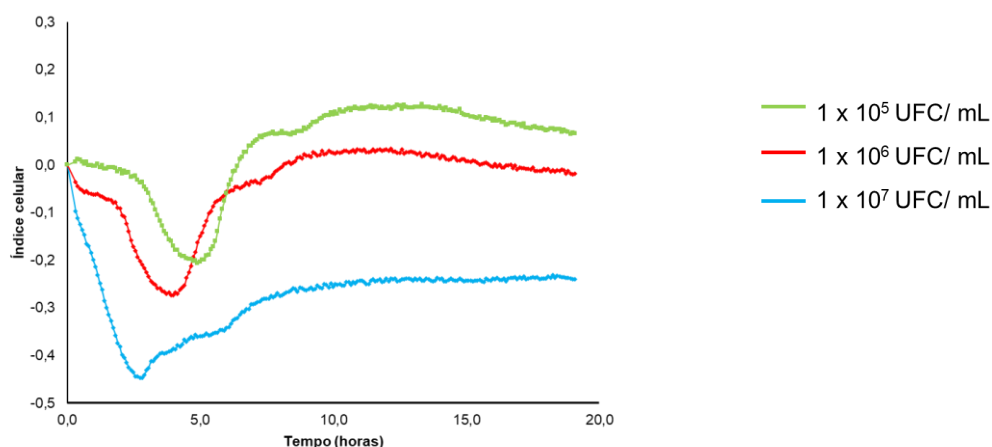
Uma análise geral da tabela anterior, permite inferir que o sobrenadante de *Aeromonas* spp. demonstrou ser mais efetivo na inibição de biofilme de *Kp* do que as próprias bactérias. Este resultado sugere que a inibição poderá ser desencadeada por um (ou vários) composto(s) presente(s) no sobrenadante. Seria importante estudar a composição do sobrenadante das *Aeromonas* deste trabalho, para averiguar a presença do mesmo composto ou família de compostos. Bansal e colaboradores <sup>(216, 217)</sup> descreveram este fenómeno para outra espécie de *Aeromonas* (*A. punctata*) e o seu sobrenadante, afirmando que estes apresentam capacidade para inibir o biofilme de *Kp* do serótipo K2 (*K. pneumoniae* clínicas). Embora não tenham sido caracterizados os isolados de *Kp* ambientais quanto ao seu serótipo, o K2 não é frequente neste grupo <sup>(218, 219)</sup>. Para além desta característica das *Kp*, que pode condicionar a formação e manutenção do seu biofilme, importa identificar o mecanismo através do qual as *Aeromonas* interferem com o mesmo. Os fatores que desencadeiam a dispersão de um biofilme não são, ainda, completamente conhecidos. Contudo, é conhecido que a disponibilidade de nutrientes, a presença de compostos tóxicos de sistemas de deteção de *quorum* e bacteriófagos estão envolvidos nesta fase do ciclo de vida do biofilme <sup>(220)</sup>. No caso das *Aeromonas*, parece existir a capacidade de degradar alguns compostos da matriz polimérica extracelular do próprio biofilme ou do de outras bactérias, conduzindo à dispersão do mesmo <sup>(221)</sup>.

### Método de medição da impedância elétrica - Índice celular

O método convencional (cristal violeta), foi o método utilizado na componente experimental de todo o trabalho. Contudo, existem várias desvantagens associadas ao mesmo, como o tempo dispendido na realização dos ensaios, o volume de trabalho, erros associados ao uso de corantes e o facto de apenas avaliar a biomassa, e não o estado metabólico das bactérias.

Assim sendo, foi utilizado o método da determinação da impedância elétrica, com recurso ao equipamento xCELLigence, que apresenta a particularidade de monitorizar a aderência das células às superfícies <sup>(155)</sup>; e de promover leituras automáticas, monitorizando os biofilmes em tempo real <sup>(222, 223)</sup>.

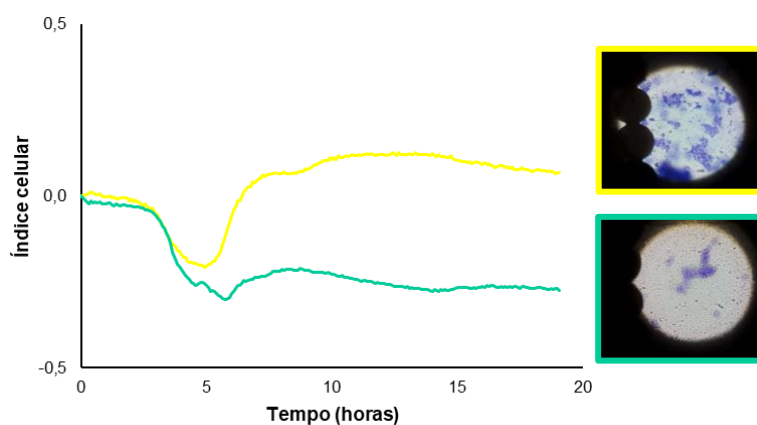
Face ao referido, importou o estudo de uma relação entre os métodos. Para isso, foi determinada a concentração ótima do inóculo inicial para formação de biofilme. Para três concentrações, é apresentado, na figura 4.12, o exemplo da evolução do índice celular de *E. coli* 42, ao longo de 19 horas.



**Figura 4.12 - Determinação da concentração ótima: Ensaio de impedância elétrica.**  
Foram testadas três concentrações distintas de *E. coli* 42.

Na figura 4.12, é notado que a concentração mais elevada ( $1 \times 10^7$  UFC/ml) demonstrou ser a menos favorável para a formação de biofilme. Para as restantes concentrações, foram observados perfis semelhantes, embora a concentração mais baixa ( $1 \times 10^5$  UFC/ml) origine valores de índice celular (biofilme), a partir das 5 horas. Contudo, uma vez que pelo método convencional se adotou uma concentração inicial de  $1 \times 10^6$  UFC/ml, esta foi a selecionada, de modo a permitir uma comparação direta entre os métodos.

Após a seleção da concentração, foi procurada uma relação entre os valores de impedância, a fotografia do biofilme, nas placas, e o valor das absorvâncias, no final do ensaio, e os resultados são apresentados na figura 4.13.

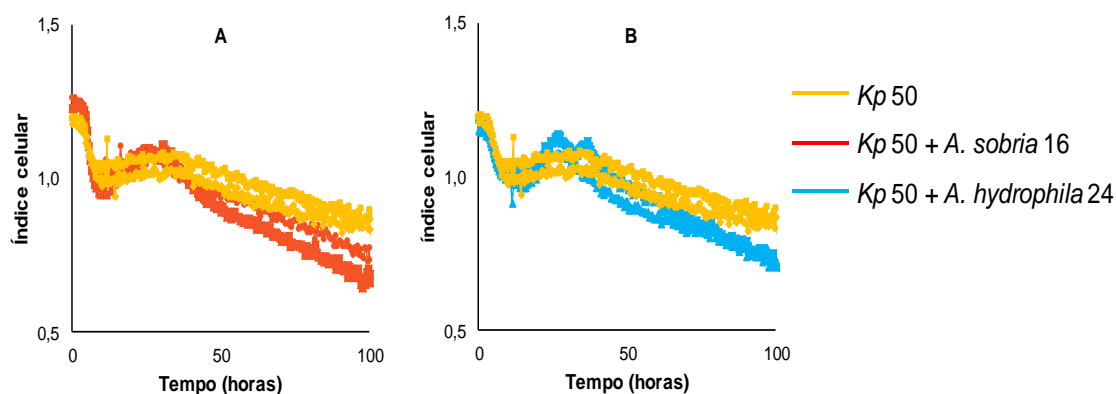


**Figura 4.13 - Relação entre índice celular e absorvância.**

As curvas apresentadas na figura são referentes a *A. sobria* 16 (■) e de *E. coli* 42 (■). As fotografias e as absorvâncias a 570 nm foram obtidas às 19 horas, no final do primeiro ensaio do método de determinação da impedância elétrica. Nas imagens, a quantidade de manchas azuis reflete a formação de biofilme pelos isolados.

A observação da figura 4.13 sugere a existência de uma relação direta entre os dois métodos. A um índice celular mais elevado está associado um valor de absorvância igualmente elevado, que pode ser comprovado pela maior formação de biofilme (existência de maior quantidade de manchas azuis, imagem contornada a amarelo) e vice-versa.

A concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/ml foi, posteriormente, utilizada no ensaio de avaliação do efeito de *Aeromonas* spp. nos biofilmes maduros das seis *Kp*. Aqui, distintamente do método convencional, o efeito de *Aeromonas* no biofilme de *Kp* foi monitorizado continuamente durante, aproximadamente, quatro dias (100 horas). As figuras 4.14 A e B apresentam, como exemplo representativo, o efeito de *A. sobria* 16 e de *A. hydrophila* 24, respectivamente, no biofilme maduro de *Kp* 50, ao longo de 100 horas.



**Figura 4.14 - Efeito de *A. sobria* ou de *A. hydrophila* no biofilme de uma *Kp*.**

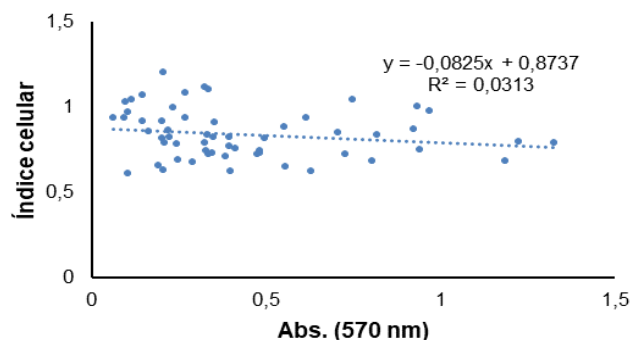
Foram adicionadas as espécies *A. sobria* 16 (A) e *A. hydrophila* 24 (B), ao biofilme maduro da *Kp* 50.



Como referido anteriormente, existem evidências na literatura de que uma espécie de *Aeromonas* spp. tem a capacidade para inibir o biofilme de uma estirpe de *Klebsiella* clínica <sup>(216, 217)</sup>. No ensaio realizado, foi observada, para algumas *Kp*, a tendência descrita. Nas figuras 4.14 **A** e **B**, é observado, de facto, a partir de perto das 40 horas, um decréscimo da biomassa de *Kp* quando co-existe, *in vitro*, com as *Aeromonas* spp. Este fenótipo foi o previsto, contudo a tendência foi atingida mais tarde do que o esperado. O facto de ter sido prolongado o ensaio, para 100 horas, levanta algumas questões como, por exemplo, a evaporação do meio de cultura, ao longo do tempo. Esta evaporação pode originar erros de leitura, dificultando a interpretação dos resultados, não sendo possível a sua conclusão. Assim, quando não foi observado o fenótipo descrito, ou a relação não se verificou, ou houve um problema de evaporação. Contudo, é desconhecido se tal se deveu ao serótipo do isolado de *Kp* ou a um erro experimental. A otimização do protocolo experimental que permita o prolongamento do ensaio, poderá resolver este problema.

#### 4.2.2.3.1 Análise dos métodos de monitorização de biofilmes

Através da observação da figura 4.13, é sugerida, aparentemente, uma relação direta entre os dois métodos de monitorização de biofilmes (absorvância e índice celular), no término do ensaio. Como tal, importou, no presente ponto, a comparação estatística dos resultados entre os métodos, que se realizou através da determinação da correlação entre os valores médios do índice celular e de absorvância, a 570 nm, apresentada na figura 4.15.



**Figura 4.15 - Análise estatística: Métodos de formação de biofilme.**

Os IC foram determinados através dos valores médios de cada período de monitorização de biofilmes (2, 4, 6, 8 e 24 horas) (n= 57).

A interpretação da figura 4.15 permite afirmar que os dois métodos de monitorização de biofilmes são estatisticamente diferentes, para um nível de significância de 0,05 (coeficiente de correlação (R) = - 0,177,  $p < 0,05$ , g.l. = 55), sendo que o  $R_{\text{tabelado}}$  tem o valor de 0,261.

É comprovado, na literatura, que a comparação entre os dois métodos existe, maioritariamente, com uma correlação significativa e direta <sup>(224, 225)</sup>. Podem existir inúmeras justificações para as diferenças entre os valores de cada um dos métodos. Este foi um ensaio exploratório, em que o equipamento foi disponibilizado durante um curto período de tempo, o que impossibilitou a

repetição dos ensaios. Além disso, não foi possível a execução de replicados suficientes de cada suspensão.

Distintamente do método convencional, onde o biofilme se forma sobre superfícies de poliestireno, as placas utilizadas no ensaio de impedância elétrica apresentam revestimento em ouro, o que pode comprometer a capacidade de formação de biofilme pelas bactérias, tendo sido igualmente descrito por outros autores <sup>(225)</sup>.

Podem ter existido, além do supramencionado, problemas de evaporação dos meios de cultura no ensaio de impedância elétrica, como referido anteriormente, o que dificulta a interpretação dos resultados.

O método convencional é económico, de fácil implementação e não requer técnicos especializados. Em contra-partida, é demorado, sendo requerido um esforço de trabalho significativo e onde um erro num ensaio pode comprometer a experiência. Além disso, as determinações da absorvância consistem num único ponto no tempo, sendo necessários inúmeros ensaios para se obter um número considerável de valores ao longo do tempo <sup>(226)</sup>. O método de determinação da impedância elétrica apresenta, por um lado, custos muito elevados e a sua implementação e utilização requerem técnicos especializados. Além disso, os biossensores *online* são incapazes de realizar uma análise multicanal paralela <sup>(227)</sup>. Este método apresenta, porém, a vantagem de obter uma monitorização contínua e em tempo real sendo, por isso, requerida uma carga de trabalho reduzida <sup>(223)</sup>. Seria, no entanto, necessário um aprofundamento do estudo da impedância elétrica e do funcionamento do equipamento, bem como a execução de vários ensaios experimentais.

## 5 Conclusões e propostas de intervenção

Um dos maiores problemas da atualidade é a presença de microrganismos patogénicos na água, nos alimentos e em instalações de cuidados de saúde, o que aumenta o risco de infeções no Homem. Os resultados do presente estudo permitem alertar para o crescimento de bactérias de *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. e *K. pneumoniae* a todas as temperaturas testadas (5, 25, 37 e 45 °C), exceto a última para as *Aeromonas* spp. Os isolados apresentaram, na sua generalidade, tempos de geração inferiores a 88,8 minutos, o que é traduzido no seu rápido crescimento/colonização, tendo crescido, preferencialmente, a 25 e 37 °C.

O tempo de geração das bactérias tem efeito na formação de biofilmes microbianos, e é concluído que a maior parte destas bactérias (75 %) tem capacidade para formar biofilmes *in vitro*, bem como capacidade de deslizamento em meio semi-sólido.

O estudo de biofilmes binários permitiu concluir que 90 % dos biofilmes estudados apresentaram relações de competição entre as espécies, sugerindo qual a espécie que aparentemente predomina no ambiente. Além disso, conclui-se que as competições foram potenciadas em co-culturas, *in vitro*, de isolados provenientes de meses diferentes de colheita.

A comparação entre os dois métodos de monitorização de biofilmes originou resultados contraditórios na análise qualitativa e na análise estatística, pelo que seria necessário um aprofundamento do estudo do método alternativo.

Em suma, é muito importante a tomada de medidas que vão de encontro ao controlo de microrganismos patogénicos e de biofilmes no ambiente, como estratégias de prevenção e de monitorização contínuas: limpezas/desincrustações, renovação da água e análises periódicas, pois é crescente o registo de infeções, agudas ou crónicas, associadas a biofilmes microbianos na água.

A qualidade microbiológica da água deve ser monitorizada regularmente. Assim, além da quantidade de indicadores microbiológicos avaliados, importa a sua especificidade face às infeções provocadas no Homem, o que permitirá a redução dos riscos para saúde humana. À semelhança do que acontece nos Estados Unidos da América <sup>(45)</sup>, a obrigatoriedade da monitorização da presença de *Aeromonas* spp., além dos indicadores microbiológicos já utilizados, na Europa, poderia contribuir para a redução de doenças veiculadas pelas águas.

A introdução de plantas específicas, referidas por Satpathy e colaboradores <sup>(131)</sup>, nos lagos ornamentais, poderá contribuir substancialmente para a melhoria da qualidade microbiológica das águas, dada a sua capacidade para inibir ou reduzir a formação de biofilme pelos microrganismos.



## 6 Perspetivas de trabalhos futuros

No presente trabalho, apenas foi apresentada a análise de biofilmes binários, devido à complexidade das interações em biofilmes constituídos por um maior número de espécies. Seria importante uma identificação e análise dessas interações, em biofilmes com mais do que duas espécies, de forma a permitir uma melhor compreensão acerca dos mecanismos que as desencadeiam, analisando os efeitos de uma espécie sobre outra(s). Este estudo permitirá avaliar a patogénese de infeções, pois as interações que subsistem entre as bactérias desempenham um papel importante na mesma <sup>(180)</sup>.

Num biofilme, os isolados podem contribuir com quantidades distintas para a biomassa. A identificação das interações em biofilmes polimicrobianos é mais rigorosa quando é possível a determinação dessas contribuições. Essa contabilização permitirá um aprofundamento do estudo e uma melhor interpretação das interações entre as espécies. O método proposto é muito utilizado nesta área e consiste na reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), medida em tempo real <sup>(8, 228, 229)</sup>. Este método é simples, rápido e económico, permitindo a descriminação do número de genes pertencentes a cada espécie do biofilme <sup>(230)</sup>.

Uma outra área de interesse numa perspetiva de investigação aplicada, será o desenvolvimento de processos alternativos para controlo da qualidade microbiológica de águas ornamentais. Uma estratégia pluridisciplinar sustentável, que compreenda tanto o desenvolvimento de novos materiais a utilizar na construção de lagos artificiais, ou outros, como de métodos alternativos para controlo microbiológico da água com menor impacto ambiental.



## 7 Referências bibliográficas

1. Kallmeyer, J.; Pockalny, R.; Adhikari, R. R.; Smith, D. C. & D'Hondt, S. (2012) Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proceedings of the national academy of sciences*, **109** (40): 16213–16216. DOI: 10.1073/pnas.1203849109.
2. Thajudeen, J.; Yousuf, J.; Veetil, V. P.; Varghese, S.; Singh, A. & Abdulla, M. H. (2017) Nitrogen fixing bacterial diversity in a tropical estuarine sediments. *World journal of microbiology and biotechnology*, **33** (2). DOI: 10.1007/s11274-017-2205-x.
3. Trivedi, P.; Delgado-Baquerizo, M.; Trivedi, C.; Hu, H.; Anderson, I. C.; Jeffries, T. C.; Zhou, J. & Singh, B. K. (2016) Microbial regulation of the soil carbon cycle: evidence from gene–enzyme relationships. *The ISME journal*, **10** (11): 2593–2604. DOI: 10.1038/ismej.2016.65.
4. Logue, J. B.; Stedmon, C. A.; Kellerman, A. M.; Nielsen, N. J.; Andersson, A. F.; Laudon, H.; Lindström, E. S. & Kritzberg, E. S. (2015) Experimental insights into the importance of aquatic bacterial community composition to the degradation of dissolved organic matter. *The ISME journal*, **10** (3): 533–545. DOI: 10.1038/ismej.2015.131.
5. Ghosal, D.; Ghosh, S.; Dutta, T. K. & Ahn, Y. (2016) Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in microbiology*, **7**. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01369.
6. Marques, F. Z.; Nelson, E.; Chu, P. Y.; Horlock, D.; Fiedler, A.; Ziemann, M.; Tan, J. K.; Kuruppu, S.; Rajapakse, N. W.; El-Osta, A.; Mackay, C. R. & Kaye, D. M. (2017) High-fiber diet and acetate supplementation development of hypertension and heart failure in hypertensive mice. *Circulation*, **135** (10): 964–977. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024545.
7. Thorburn, A. N.; McKenzie, C. I.; Shen, S.; Stanley, D.; Macia, L.; Mason, L. J.; Roberts, L. K.; Wong, C. H. Y.; Shim, R.; Robert, R.; Chevalier, N.; Tan, J. K.; Mariñom, E.; Moore, R. J.; Wong, L.; McConville, M. J.; Tull, D. L.; Wood, L. G.; Murphy, V. E.; Mattes, J.; Gibson, P. G. & Mackay, C. R. (2015) Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nature communications*, **6**: 7320. DOI: 10.1038/ncomms8320.
8. Raghupathi, P. K.; Liu, W.; Sabbe, K.; Houf, K.; Burmølle, M. & Sørensen, S. J. (2018) Synergistic interactions within a multispecies biofilm enhance individual species protection against grazing by a pelagic protozoan. *Frontiers in microbiology*, **8**: 1–11. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02649.
9. Hoxie, N. J.; Davis, J. P.; Vergeront, J. M.; Nashold, R. D. & Blair, K. A. (1997) Cryptosporidiosis-associated mortality following a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *American journal of public health*, **87** (12): 2032–2035. DOI: 10.2105/ajph.87.12.2032.
10. Payment, P.; Siemiatycki, J.; Richardson, L. Renaud, G.; Franco, E. & Prévost, M. (1997) A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *International journal of environmental health research*, **7** (1): 5–31. DOI: 10.1080/09603129773977.
11. Moe, C. L. (2007) Waterborne transmission of infectious agents. *Manual of environmental Microbiology*. Pp.184-204, cap. 17. 2ª edição. Eds: Hurst, C.; Crawford, R. L.; Knudsen, G. R.; McInerney, M. J. & Stetzenbach, L. D. ASM Press, Washington, D.C.
12. Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, **8** (9): 623–633. DOI: 10.1038/nrmicro2415.
13. Lawrence, J. R.; Neu, T. R. & Marshall, K. C. (2002) Colonization, adhesion, aggregation and biofilms. *Manual of environmental Microbiology*. Pp. 466-477, cap. 42. 2ª edição. Eds: Hurst, C.; Crawford, R. L.; Knudsen, G. R.; McInerney, M. J. & Stetzenbach, L. D. ASM Press, Washington, D.C.

14. WHO - World Health Organization (2003) Emerging issues in water and infectious disease. 24pp. Disponível em formato digital em: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/emerging.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/emerging.pdf).
15. UNICEF (2017) Water, Sanitation and Hygiene. Disponível em formato digital em: [https://www.unicef.org/wash/3942\\_43084.html](https://www.unicef.org/wash/3942_43084.html). Acesso a 10 de fevereiro de 2019.
16. WHO – World Health Organization (n.d) Waterborne disease related to unsafe water and sanitation. Disponível em: <https://www.who.int/sustainable-development/housing/health-risks/waterborne-disease/en/>. Acesso a 5 de janeiro de 2019.
17. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control (n.d) Water-borne diseases. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/en/climate-change/climate-change-europe/water-borne-diseases>. Acesso a 10 de janeiro de 2019.
18. Diederer, B. M. W. (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of infection*, **56** (1): 1–12. DOI: 10.1016/j.jinf.2007.09.010.
19. WHO – World Health Organization (2007) *Legionella* and the prevention of legionellosis. Disponível em formato digital em: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/legionella.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf).
20. Rowbotham, T. J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of clinical pathology*, **33** (12): 1179–1183. DOI: 10.1136/jcp.33.12.1179.
21. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control (2014) Rapid Risk Assessment: Outbreak of Legionnaires' disease in the Lisbon area, Portugal. 14 November 2014. pp. 1-6. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-outbreak-legionnaires-disease-lisbon-area-portugal-14>. Acesso a 7 de janeiro de 2019.
22. ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control (2016) SURVEILLANCE REPORT Legionnaires' disease in Europe 2014. Disponível em formato digital em: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/legionnaires-disease-europe-2014.pdf>.
23. Hossain, S.; Silva, B. C. J.; Dahanayake, P. S & Heo, G. J. (2018) Characterization of virulence properties and multi-drug resistance profiles in motile *Aeromonas* spp. isolated from zebrafish (*Danio rerio*). *Letters in applied microbiology*, **67** (6): 598-605. DOI: 10.1111/lam.13075.
24. Smith, K. F.; Schmidt, V.; Rosen, G. E. & Amaral-Zettler, L. (2012) Microbial diversity and potential pathogens in ornamental fish aquarium water. *PLOS ONE*, **7** (9): e39971. DOI: 10.1371/journal.pone.0039971. Disponível em formato digital em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3435374/pdf/pone.0039971.pdf>. Acesso a 1 de dezembro de 2018.
25. Trust, T. J. & Bartlett, K. H. (1974) Occurrence of potential pathogens in water containing ornamental fishes. *Applied microbiology*, **28** (1): 35–40. Disponível em formato digital em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186581/pdf/applmicro00013-0057.pdf>.
26. CBD - *Convention on biological diversity* (2014) Invasive alien species: progress report. *Conference of the parties to the convention on biological diversity UNEP*. Disponível em formato digital em: <https://www.cbd.int/doc/meetings/cop/cop-12/official/cop-12-19-en.pdf>.
27. Nascimento, M.; Rodrigues, J.; Reis, L.; Nogueira, I.; Carvalho, P.; Brandão, J.; Duarte, A. & Jordao, L. (2016) Pathogens in Ornamental Waters: A Pilot Study. *International Journal of Environmental research and public health*, **13** (2): 216. DOI: 10.3390/ijerph13020216.
28. Bauch, C.; D'Onofrio, A.; & Manfredi, P. (2013) Behavioral epidemiology of infectious diseases: An overview. *Modeling the interplay between human behavior and the spread of infectious diseases*. Pp. 1-19. Springer, New York, NY. DOI: 10.1007/978-1-4614-5474-8.



29. Ribeiro, F. & Collares-Pereira, M. J. (2010) Life-history variability of non-native centrarchids in regulated river systems of the lower River Guadiana drainage (south-west Iberian Peninsula). *Journal of fish biology*, **76** (3): 522–537. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2009.02506.x.
30. Carreira, B. M.; Segurado, P.; Laurila, A. & Rebelo, R. (2017) Can heat waves change the trophic role of the world's most invasive crayfish? Diet shifts in *Procambarus clarkii*. *PLOS ONE*, **12** (9): e0183108. DOI: 10.1371/journal.pone.0183108.
31. Bruxelas, S.; Costa, A. M.; Bernardo, J. M. & Teixeira, A. (2010) Co-existência de duas espécies exóticas de lagostins (*Pacifastacus leniusculus* e *Procambarus clarkii*) na bacia hidrográfica do rio sabor (NW Portugal). Disponível em: <http://www2.icnf.pt/portal/pesca/resource/img/lagost/disp-coex-2>. Acesso a 5 de Janeiro de 2019.
32. Almeida, J. D. & Freitas, H. (2006) Exotic naturalized flora of continental Portugal: a reassessment. *Botanica complutensis*, **30**: 117-130. Disponível em: <http://www.herbmedit.org/boccone/24-231.pdf>.
33. Alves, C. (2007) Qualidade da água. *Tratamento de Águas de Abastecimento*. 3ª edição. Publindústria.
34. Herbert, R. A. (1999) Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS microbiology reviews*, **23** (5): 563–590. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00414.x.
35. Smith, S. V. (1984) Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine environment. *Limnology and oceanography*, **29** (6): 1149-1160. Disponível em formato digital em: <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.4319/lo.1984.29.6.1149>.
36. Redfield, A. C. (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *American scientist*, **46**: 205-222. DOI: 10.2307/27827150.
37. Toranzos, G. A.; McFeters, G. A. & Borrego, J. J. (2002) Detection of microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. *Manual of environmental microbiology*. Pp. 205-219, cap. 18. 2ª edição. Eds: Hurst, C.; Crawford, R. L.; Knudsen, G. R.; McInerney, M. J. & Stetzenbach, L. D. ASM Press, Washington, D.C.
38. Ashbolt, N. J.; Grabow, W. O. K. & Snozzi, M. (2001) Indicators of microbial water quality. *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. Pp: 289-316, cap. 13. Eds: Fewtrell, L. & Bartram, J. IWA Publishing, London, UK. Disponível em formato digital em: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/iwachap13.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/iwachap13.pdf).
39. Lei n.º 54/2005 de 15 de novembro. *Diário da República n.º 219/2005, Série I-A*. Assembleia da República. Lisboa.
40. Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro. *Diário da República n.º 235/2017, Série I*. Ministério do Ambiente. Lisboa.
41. Norma ISO 9308-1:2014. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. ISO/TC 147/SC 4 - Microbiological methods.
42. Norma ISO 9308-2: 2012. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 2: Most probable number method. ISO/TC 147/SC 4 - Microbiological methods.
43. ISO 16266-1:2006. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Part 1: Method by membrane filtration. ISO/TC 147/SC 4 - Microbiological methods.
44. Norma ISO 16266-2:2018. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* - Part 2: Most probable number method. ISO/TC 147/SC 4 - Microbiological methods.
45. EPA - Environmental Protection Agency (2001) Método 1605: *Aeromonas* in Finished Water by Membrane Filtration using Ampicillin-Dextrin Agar with Vancomycin (ADA-V). Estados Unidos da América. Disponível em formato digital em: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method\\_1605\\_2001.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method_1605_2001.pdf).

46. Dutka, B. J.; Chau, A. S. Y. & Coburn, J. (1974) Relationship between bacterial indicators of water pollution and fecal sterols. *Water research*, **8** (12): 1047–1055. DOI: 10.1016/0043-1354(74)90147-x.
47. Marzouk, Y. (1980) Relationship of viruses and indicator bacteria in water and wastewater of Israel. *Water research*, **14** (11): 1585–1590. DOI: 10.1016/0043-1354(80)90062-7.
48. Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, **11** (1): 142-201. Disponível em formato digital em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC121379/pdf/cm000142.pdf>.
49. Fegan, N.; Gobius, K. S. & Dykes, G. A. (2014) Microbiological safety of meat | Pathogenic *Escherichia coli*. *Encyclopedia of meat sciences*, 357–361. DOI: 10.1016/b978-0-12-384731-7.00035-0.
50. BioCote – Antimicrobial Technology (2016) Five facts about *E. coli*. Disponível em: <https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli/>. Acesso a 1 de dezembro de 2018.
51. Abberton, C. L.; Bereschenko, L.; Van der Wielen, P. W. J. J. & Smith, C. J. (2016) Survival, Biofilm Formation, and Growth Potential of Environmental and Enteric *Escherichia coli* Strains in Drinking Water Microcosms. *Applied and environmental microbiology*, **82** (17): 5320-5331. DOI: 10.1128/aem.01569-16.
52. Taha, O. A.; Connerton, P. L.; Connerton, I. F. & El-Shibiny, A. (2018) Bacteriophage ZCKP1: A potential treatment for *Klebsiella pneumoniae* isolated from diabetic foot patients. *Frontiers in microbiology – original research*, **9** (2127). DOI: 10.3389/fmicb.2018.02127.
53. Barati, A.; Ghaderpour, A.; Chew, L. L.; Bong, C. W.; Thong, K. L.; Ching Chong, V. & Ching Chai, L. (2016) Isolation and Characterization of Aquatic-Borne *Klebsiella pneumoniae* from Tropical Estuaries in Malaysia. *International journal of environmental research and public health*, **13** (4): 426. DOI: 10.3390/ijerph13040426.
54. Doorduyn, D. J.; Rooijackers, S. H. M.; Van Schaik, W. & Bardoel, B. W. (2016) Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*, **221** (10): 1102–1109. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.06.014.
55. Podschun, R.; Pietsch, S.; Höller, C. & Ullmann, U. (2001) Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and environmental microbiology*, **67** (7): 3325–3327. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3325-3327.2001.
56. Bagley, S. T. (1985) Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection control*, **6** (2): 52–58. DOI: 10.2307/30142713.
57. Stahlhut, S. G.; Struve, C.; Krogfelt, K. A. & Reisner, A. (2012) Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbria. *FEMS immunology medical microbiology*, **65** (2): 350–359. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00965.x.
58. Podschun, R. & Ullmann, U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, **11** (4): 589–603. Disponível em formato digital em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88898/pdf/cm000589.pdf>.
59. Spencer, R. C. (1996) Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *European journal of clinical microbiology & infection diseases*, **15** (4): 281–285. DOI: 10.1007/bf01695658.
60. Palleroni, N. J. (2010) The *Pseudomonas* Story. *Environmental microbiology*, **12** (6): 1377–1383. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x.
61. Anzai, Y.; Kim, H.; Park, J. Y.; Wakabayashi, H. & Oyaizu, H. (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **50**: 1563–1589. DOI: 10.1099/00207713-50-4-1563.
62. Baumann, P.; Bowditch, R.D.; Baumann, L. & Beaman, B. (1983) Taxonomy of Marine *Pseudomonas* Species: *P. stanieri* SP nov.; *P. perfectomarina* sp. nov., nom. rev.; *P. nautica*

- and *P. doudorofii*. *International Journal of systematic bacteriology*, **33** (4): 857-865. Disponível em formato digital em: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/33/4/ijsem-33-4-857.pdf>.
63. Winsor, G. L.; Lam, D. K. W.; Fleming, L.; Lo, R.; Whiteside, M. D.; Yu, N. Y.; Hancock, R. E. W. & Brinkman, F. S. L. (2010) *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic acids research*, **39**: D596–D600. DOI: 10.1093/nar/gkq869.
  64. Kersters, K.; Ludwig, W.; Vancanneyt, M.; De Vos, P.; Gillis, M. & Schleifer, K.-H. (1996) Recent change in the classification of the pseudomonads: an overview. *Systematic and applied microbiology*, **19** (4): 465–477. DOI: 10.1016/S0723-2020(96)80020-8.
  65. Tomás, J. M. (2012) The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISRN microbiology*: 1-22. DOI: 10.5402/2012/256261.
  66. Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2010) The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, **23**: 35-73. DOI: 10.1128/CMR.00039-09.
  67. Martin-Carnahan, A. & Joseph, S. W. (2005) Aeromonadales ord. nov. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Pp: 556-587. 2ª edição. Eds: Brenner, D. J.; Krieg, N. L.; Staley, J. T.; Garrity, G. M.; Boone, D. R.; De Vos, P.; Goodfellow, M.; Rainey, F. A.; Schleifer, K.-H. Springer link, Boston, M.A. DOI: 10.1007/0-387-28022-7\_12.
  68. Gastalho, S.; Silva, G. J. & Ramos, F. (2014) Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. *Acta farmacêutica portuguesa*, **3** (1): 29-45. Disponível em formato digital em: <http://www.actafarmacêuticaportuguesa.com/index.php/afp/article/download/40/52>.
  69. Chang, H.-L.; Chen, P.-L.; Lin, S.-Y.; Chen, T.-C.; Chang, K.; Ko, W.-C.; Lu, P.-L. & Chen, Y.-H. (2018) Two fatal cases of *Aeromonas dhakensis* bacteremia and necrotizing fasciitis in severe dengue patients. *Journal of microbiology, immunology and infection*. DOI: 10.1016/j.jmii.2018.03.003.
  70. Batra P.; Mathur, P. & Misra, M. C. (2016) *Aeromonas* spp.: an emerging nosocomial pathogen. *Journal of laboratory physicians*, **8** (1): 1-4. DOI: 10.4103/0974-2727.176234.
  71. Latif-Eugenín, F.; Beaz-Hidalgo, R. & Figueras, M. J. (2016) A culture independent method for the detection of *Aeromonas* sp. from water samples. *Italian journal of food safety*, **5** (1). DOI: 10.4081/ijfs.2016.5489.
  72. Tsai, Y.-H.; Huang, K.-C.; Huang, T.-J. & Hsu, R. W.-W. (2008) Case Reports: Fatal Necrotizing Fasciitis Caused by *Aeromonas sobria* in Two Diabetic Patients. *Clinical orthopaedics and related research*, **467** (3): 846–849. DOI: 10.1007/s11999-008-0504-0.
  73. Wadström, T. & Ljungh, Å. (1991) *Aeromonas* and *Plesiomonas* as food- and waterborne pathogens. *International journal of food microbiology*, **12** (4): 303–311. DOI: 10.1016/0168-1605(91)90144-e.
  74. Ghenghesh, K.; Ahmed, S.; El-Khalek, R. A.; Al-Gendy, A. & Klena, J. (2008) *Aeromonas*-associated infections in developing countries. *The journal of infection in developing countries*, **2** (2): 81–98. Disponível em: [https://www.academia.edu/11800063/Aeromonas-Associated\\_Infections\\_in\\_Developing\\_Countries](https://www.academia.edu/11800063/Aeromonas-Associated_Infections_in_Developing_Countries). Acesso a 10 de janeiro de 2019.
  75. Castro, L.; Vera, M.; Muñoz, J. Á.; Blázquez, M. L.; González, F.; Sand, W. & Ballester, A. (2014) *Aeromonas hydrophila* produces conductive nanowires. *Research in Microbiology*, **165** (9): 794–802. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.09.005.
  76. Nixon, S. W. (1995) Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*, **41** (1): 199–219. DOI: 10.1080/00785236.1995.10422044.
  77. Schindler, D. W. (2006) Recent advances in the understanding and management of eutrophication. *The american society of limnology and oceanography*, **51** (1, parte 2): 356–363. DOI: 10.4319/lo.2006.51.1\_part\_2.0356.

78. Carlson, R.E. (1977) A trophic state index for lakes. *Limnology and Oceanography*, **22** (2): 361-369. DOI: 10.4319/lo.1977.22.2.0361.
79. Alemayehu, D. & Hackett, F. (2016) Water Quality and Trophic State of Kaw Lake. *Journal of environmental studies*, **2** (1): 7. Disponível em formato digital em: <http://www.avensonline.org/wp-content/uploads/JES-2471-4879-02-0007.pdf>.
80. Smith, V. H. (2006) Responses of estuarine and coastal marine phytoplankton to nitrogen and phosphorus enrichment. *Limnology and oceanography*, **51**: 377–384. DOI: 10.4319/lo.2006.51.1\_part\_2.0377.
81. Conley, D. J.; Paerl, H. W.; Howarth, R. W.; Boesch, D. F.; Seitzinger, S. P.; Havens, K. E.; Lancelot, C. & Likens, G. E. (2009) ECOLOGY: Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. *Science*, **323** (5917): 1014-1015. DOI: 10.1126/science.1167755.
82. Schindler, D. W. (1974) Eutrophication and Recovery in Experimental Lakes: Implications for Lake Management, *New series*, **184** (4139): 897-899. Disponível em formato digital em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.364.7618&rep=rep1&type=pdf>.
83. Menezes, C.; Churro, C. & Dias, E. (2017) Risk Levels of Toxic Cyanobacteria in Portuguese Recreational Freshwaters. *Toxins*, **9** (10): 327. DOI: 10.3390/toxins9100327.
84. Smith, V. H. & Schindler, D. W. (2009) Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in ecology and evolution*, **24** (4). DOI: 10.1016/j.tree.2008.11.009.
85. Sheffield, C. L.; Crippen, T. L.; Poole, T. L. & Beier, R. C. (2012) Destruction of single species biofilms of *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* by dextranase, lactoferrin, and lysozyme. Artificial biofilms of alginate beads. *International microbiology*, **15**: 183–187. Disponível em formato digital em: <https://naldc.nal.usda.gov/download/58143/PDF>.
86. Sutherland, I. W. (2001) The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, **9** (5): 222-227. DOI: 10.1016/s0966-842x(01)02012-1.
87. Costerton, J. W.; Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999) Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, **284** (5418): 1318-1322. Disponível em formato digital em: <http://web.biosci.utexas.edu/psaxena/bio226r/articles/Biofilm.pdf>.
88. Sousa, S.; Bandeira, M.; Almeida Carvalho, P.; Duarte, A. & Jordão, L. (2015) Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. *International journal of mycobacteriology*, **4** (1): 36-43. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2014.11.065.
89. Burmølle, M.; Ren, D.; Bjarnsholt, T. & Sørensen, S. J. (2014) Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends in microbiology*, **22** (2): 84-91. DOI: 10.1016/j.tim.2013.12.004.
90. Shemesh, M.; Tam, A. & Steinberg, D. (2007) Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. *Microbiology*, **153** (5): 1307–1317. DOI: 10.1099/mic.0.2006/002030-0.
91. Wimpenny, J. W. T. (2000) An overview of biofilms as functional communities. *Community structure and co-operation in biofilms*, 1–24. DOI: 10.1017/cbo9780511754814.002.
92. Mikkelsen, H.; Duck, Z.; Lilley, K. S. & Welch, M. (2007) Interrelationships between Colonies, Biofilms, and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, **189** (6): 2411–2416. DOI: 10.1128/jb.01687-06.
93. Waite, R. D.; Papakonstantinou, A.; Littler, E. & Curtis, M. A. (2005) Transcriptome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Growth: Comparison of Gene Expression in Planktonic Cultures and Developing and Mature Biofilms. *Journal of bacteriology*, **187** (18): 6571–6576. DOI: 10.1128/jb.187.18.6571-6576.2005.

94. Ansari, M. I.; Schiwon, K.; Malik, A. & Grohmann, E. (2012) Biofilm Formation by Environmental Bacteria. *Environmental protection strategies for sustainable development*, 341–377. DOI: 10.1007/978-94-007-1591-2\_11.
95. Diggle, S. P.; Crusz, S. A. & Cámara, M. (2007) Quorum sensing. *Current biology*, **17** (21): R907–R910. DOI: 10.1016/j.cub.2007.08.045.
96. Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, **2** (2): 95–108. DOI: 10.1038/nrmicro821.
97. O'Toole, G.; Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000) Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual review of microbiology*, **54** (1): 49–79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.
98. Bandeira, M.; Borges, V.; Gomes, J. P.; Duarte, A. & Jordão, L. (2017) Insights on *Klebsiella pneumoniae* Biofilms Assembled on Different Surfaces Using Phenotypic and Genotypic Approaches. *Microorganisms*, **5** (2): 16. DOI: 10.3390/microorganisms5020016.
99. Monroe, D. (2007) Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS biology*, **5** (11): e307. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050307.
100. Marshall, K. C. (1985) Mechanisms of bacterial adhesion at solid-water interfaces. *Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance*. Pp. 133–161. Eds: Savage, D. C. & Fletcher, M. Springer, Boston, M.A. DOI: 10.1007/978-1-4615-6514-7\_6.
101. Azeredo, J.; Azevedo, N. F.; Briandet, R.; Cerca, N.; Coenye, T.; Costa, A. R.; Desvaux, M.; Bonaventura, G. D.; Hébraud, M.; Jaglic, Z.; Kačániová, M.; Knøchel, S.; Lourenço, A.; Mergulhão, F.; Meyer, R.L.; Nychas, G.; Simões, M.; Tresse, O. & Sternberg, C. (2016) Critical review on biofilm methods. *Critical reviews in microbiology*, **43** (3): 313–351. DOI: 10.1080/1040841x.2016.1208146.
102. Montanaro, L.; Poggi, A.; Visai, L.; Ravaioli, S.; Campoccia, D.; Speziale, P. & Arciola, C. R. (2011) Extracellular DNA in Biofilms. *The international journal of artificial organs*, **34** (9): 824–831. DOI: 10.5301/ijao.5000051.
103. Kostakioti, M.; Hadjifrangiskou, M. & Hultgren, S. J. (2013) Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold spring harbor perspectives in medicine*, **3** (4): a010306. DOI: 10.1101/cshperspect.a010306.
104. Hong, S. H.; Lee, J. & Wood, T. K. (2010) Engineering global regulator Hha of *Escherichia coli* to control biofilm dispersal. *Microbial biotechnology*, **3** (6): 717–728. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2010.00220.x.
105. Rowe, M. C.; Withers, H. L. & Swift, S. (2010) Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. *FEMS microbiology letters*, **307** (1): 102–109. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.01968.x.
106. Karatan, E. & Watnick, P. (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and molecular biology reviews*, **73** (2): 310–347. DOI: 10.1128/mmbr.00041-08.
107. Sauer, K.; Cullen, M. C.; Rickard, A. H.; Zeef, L. A.; Davies, D. G. & Gilbert, P. (2004) Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of bacteriology*, **186** (21): 7312–7326. DOI: 10.1128/JB.186.21.7312-7326.2004.
108. Wey, J.; Scherwass, A.; Norf, H.; Arndt, H. & Weitere, M. (2008) Effects of protozoan grazing within river biofilms under semi-natural conditions. *Aquatic microbial ecology*, **52**: 283–296. DOI: 10.3354/ame01236.
109. Madsen, J. S.; Burmølle, M.; Hansen, L. H. & Sørensen, S. J. (2012) The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS immunology & medical microbiology*, **65** (2): 183–195. DOI: 10.1111/j.1574-695x.2012.00960.x.

110. Rao, D.; Webb, J. S. & Kjelleberg, S. (2005) Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and environmental microbiology*, **71** (4): 1729-1736. DOI: 10.1128/AEM.71.4.1729-1736.2005.
111. Klayman, B. J.; Volden, P. A.; Stewart, P. S. & Camper, A. K. (2009) *Escherichia coli* O157:H7 Requires Colonizing Partner to Adhere and Persist in a Capillary Flow Cell. *Environmental science & technology*, **43** (6): 2105–2111. DOI: 10.1021/es802218q.
112. Yamada, M.; Ikegami, A. & Kuramitsu, H. K. (2005) Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS microbiology letters*, **250** (2): 271–277. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.019.
113. Filoche, S. K.; Anderson, S. A. & Sissons, C. H. (2004) Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral microbiology and immunology*, **19** (5): 322–326. DOI: 10.1111/j.1399-302x.2004.00164.x.
114. Foster, K. R. & Bell, T. (2012) Competition, Not Cooperation, Dominates Interactions among Culturable Microbial Species. *Current biology*, **22** (19): 1845–1850. DOI: 10.1016/j.cub.2012.08.005.
115. Chorianopoulos, N. G.; Giaouris, E. D.; Skandamis, P. N.; Haroutounian, S. A. & Nychas, G.-J. (2008) Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of applied microbiology*, **104** (6): 1586–1596. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03694.x.
116. Habimana, O.; Møretrø, T.; Langsrud, S.; Vestby, L. K.; Nesse, L. L. & Heir, E. (2010) Micro ecosystems from feed industry surfaces: a survival and biofilm study of *Salmonella* versus host resident flora strains. *BMC veterinary research*, **6**: 48. DOI: 10.1186/1746-6148-6-48.
117. Husain, F. M.; Ahmad, I.; Asif, M. & Tahseen, Q. (2013) Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of biosciences*, **38** (5): 835–844. DOI: 10.1007/s12038-013-9385-9.
118. Rutherford, S. T. & Bassler, B. L. (2012) Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold spring harbor perspectives in medicine*, **2** (11): a012427-a012427. DOI: 10.1101/cshperspect.a012427.
119. Ng, W.-L. & Bassler, B. L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics*, **43** (1): 197–222. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134304.
120. Cos, P.; Toté, K.; Horemans, T. & Maes, L. (2010) Biofilms: An Extra Hurdle for Effective Antimicrobial Therapy. *Current pharmaceutical design*, **16** (20): 2279–2295. DOI: 10.2174/138161210791792868.
121. Cvitkovitch, D. G.; Li, Y.-H. & Ellen, R. P. (2003) Quorum sensing and biofilm formation in *Streptococcal* infections. *The journal of clinical investigation*, **112**: 1626-1632. DOI: 10.1172/JCI20430.
122. Bjarnsholt, T.; Alhede, M.; Alhede, M.; Eickhardt-Sørensen, S. R.; Moser, C.; Kühl, M.; Jensen, P.Ø. & Høiby, N. (2013) The *in vivo* biofilm. *Trends in microbiology*, **21** (9): 466–474. DOI: 10.1016/j.tim.2013.06.002.
123. López, D.; Vlamakis, H. & Kolter, R. (2010) Biofilms. *Cold spring harbour perspectives in biology*. **2** (7): a000398-a000398. DOI: 10.1101/cshperspect.a000398.
124. Donlan, R. M. (2008) Biofilms on central venous catheters: Is eradication possible? *Current topics in microbiology and immunology*, **322**: 133–161. DOI: 10.1007/978-3-540-75418-3\_7.
125. Tascini, C.; Sozio, E.; Corte, L.; Sbrana, F.; Scarparo, C.; Ripoli, A.; Bertolino, G.; Merelli, M.; Tagliaferri, E.; Corcione, A.; Bassetti, M.; Cardinali, G. & Menichetti, F. (2017) The role of biofilm forming on mortality in patients with candidemia: a study derived from real world data. *Infectious diseases*, 1-6. DOI: 10.1080/23744235.2017.1384956.

126. Rajendran, R.; Sherry, L.; Nile, C. J.; Sherriff, A.; Johnson, E. M.; Hanson, M. F. & Ramage, G. (2016) Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012–2013. *Clinical microbiology and infection*, **22** (1), 87–93. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.09.018.
127. Barsoumian, A. E.; Mende, K.; Sanchez, C. J.; Beckius, M. L.; Wenke, J. C.; Murray, C. K. & Akers, K. S. (2015) Clinical infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review. *BMC infectious diseases*, **15**: 223. DOI: 10.1186/s12879-015-0972-2.
128. Wolcott, R. D.; Rhoads, D. D.; Bennett, M. E.; Wolcott, B. M.; Gogokhia, L.; Costerton, J. W. & Dowd, S. E. (2010) Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *Journal of wound care*, **19** (2): 45–53. DOI: 10.12968/jowc.2010.19.2.46966.
129. Donlan, R. M. (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging infectious diseases*, **8** (9): 881–890. DOI: 10.3201/eid0809.020063.
130. Donlan, R. M. (2001) Biofilms and device-associated infections. *Emerging infectious diseases*, **7** (2): 277–281. DOI: 10.3201/eid0702.700277.
131. Satpathy, S.; Sem, S.K.; Pattanaik, S. & Raut, S. (2016) Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, **7**: 56–66. DOI: 10.1016/j.bcab.2016.05.002.
132. Meiron, T. & Saguy, L. (2007) Adhesion modeling on rough low linear density poly-ethylene. *Journal of food science*, **72**: E485–E491. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00523.x.
133. Bucs, S. S.; Linares, R. V.; Farhat, N.; Matin, A.; Khan, Z.; van Loosdrecht, M. C. M.; Yang, R.; Wang, M.; Gleason, K. K.; Kruithof, J. C.; Vrouwenvelder, J. S. (2017) Coating of reverse osmosis membranes with amphiphilic copolymers for biofouling control. *Desalination and water treatment*, **68**: 1–11 DOI: 10.5004/dwt.2017.20369.
134. Araújo, P. A.; Miller, D. J.; Correia, P. B.; van Loosdrecht, M. C. M.; Kruithof, J. C.; Freeman, B. D.; Paul, D. R. & Vrouwenvelder, J. S. (2012) Impact of feed spacer and membrane modification by hydrophilic, bactericidal and biocidal coating on biofouling control. *Desalination*, **295**: 1–10. DOI: 10.1016/j.desal.2012.02.026.
135. Yi, Z.; Zhu, L.-P.; Xu, Y.-Y.; Zhao, Y.-F.; Ma, X.-T. & Zhu, B.-K. (2010) Polysulfone-based amphiphilic polymer for hydrophilicity and fouling-resistant modification of polyethersulfone membranes. *Journal of membrane science*, **365** (1–2): 25–33. DOI: 10.1016/j.memsci.2010.08.001.
136. Zhao, Y.-H.; Zhu, B.-K.; Kong, L. & Xu, Y.-Y. (2007) Improving Hydrophilicity and Protein Resistance of Poly(vinylidene fluoride) Membranes by Blending with Amphiphilic Hyperbranched-Star Polymer. *Langmuir*, **23** (10): 5779–5786. DOI: 10.1021/la070139o.
137. Borges, A.; Serra, S.; Abreu, A. C.; Saavedra, M. J.; Salgado, A.; Simões, M. (2014) Evaluation of the effects of selected phytochemicals on *quorum sensing* inhibition and *in vitro* cytotoxicity. *Biofouling*, **30**: 183–195. DOI: 10.1080/08927014.2013.852542.
138. Lee, J.-H.; Kim, Y.-G.; Cho, H. S.; Ryu, S. Y.; Cho, M. H. & Lee, J. (2014) Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. *Phytomedicine*, **21**(8–9): 1037–1042. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.04.008.
139. Magesh, H.; Kumar, A.; Alam, A.; Priyam, S. U.; Sumantran, V. N. & Vaidyanathan, R. (2013) Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Indian journal of experimental biology*, **51** (9): 764–772. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/259497577\\_Identification\\_of\\_natural\\_compounds\\_which\\_inhibit\\_biofilm\\_formation\\_in\\_clinical\\_isolates\\_of\\_Klebsiella\\_pneumoniae](https://www.researchgate.net/publication/259497577_Identification_of_natural_compounds_which_inhibit_biofilm_formation_in_clinical_isolates_of_Klebsiella_pneumoniae). Acesso a 20 de dezembro de 2019.
140. Artini, M., Papa, R., Barbato, G., Scoarughi, G. L., Cellini, A., Morazzoni, P.; Bombardelli, E. & Selan, L. (2012) Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived

- natural compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **20** (2): 920–926. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.11.052.
141. Zhou, L.; Zheng, H.; Tang, Y.; Yu, W. & Gong, Q. (2012) Eugenol inhibits *quorum sensing* at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnology letters*, **35** (4): 631–637. DOI: 10.1007/s10529-012-1126-x.
  142. Ding, X.; Yin, B.; Qian, L.; Zeng, Z.; Yang, Z.; Li, H.; Lu, Y. & Zhou, S. (2011) Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of medical microbiology*, **60** (12): 1827–1834. DOI: 10.1099/jmm.0.024166-0.
  143. Walencka, E.; Rozalska, S.; Wysokinska, H.; Rozalski, M.; Kuzma, L. & Rozalska, B. (2007) Salvipisone and Aethiopinone from *Salvia sclarea* Hairy Roots Modulate Staphylococcal Antibiotic Resistance and Express Anti-Biofilm Activity. *Planta medica*, **73** (6): 545–551. DOI: 10.1055/s-2007-967179.
  144. LeChevallier, M. W. & Au, K. K. (2004) Water Treatment and Pathogen Control. Process Efficiency in Achieving Safe Drinking-Water. *Water intelligence online*, **12**. DOI: doi:10.2166/9781780405858.
  145. Berry, D.; Xi, C. & Raskin, L. (2006) Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Current opinion in biotechnology*, **17** (3): 297–302. DOI: 10.1016/j.copbio.2006.05.007.
  146. Gagnon, G. A.; Rand, J. L.; O'Leary, K. C.; Rygel, A. C.; Chauret, C. & Andrews, R. C. (2005) Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. *Water research*, **39**: 1809-1817. DOI: 10.1016/j.watres.2005.02.004.
  147. Keevil, C. W.; Mackerness, C. W. & Colbourne, J. S. (1990) Biocide treatment of biofilms. *International biodeterioration*, **26** (2-4): 169–179. DOI: 10.1016/0265-3036(90)90057-e.
  148. Ferrante, M.; Copat, C.; Mauceri, C.; Grasso, A.; Schilirò, T.; Gilli, G. (2015) The importance of indicators in monitoring water quality according to European directives. *Epidemiologia & prevenzione*, **39** (4): 71-75. Disponível em formato digital em: [http://www.epiprev.it/materiali/suppl/2015/EP2015\\_V4S1\\_071.pdf](http://www.epiprev.it/materiali/suppl/2015/EP2015_V4S1_071.pdf).
  149. Morgado, P.; Rodrigues, J.; Grossinho, J.; Rebelo, H.; Nogueira, I. & Jordão, L. (2018) Pathogens in Ornamental and Recreational Waters: A Risk Assessment Study. *Repositório científico do Instituto Nacional de Saúde*. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.18/5774>. Acesso a 15 de janeiro de 2019.
  150. Gavín, R.; Merino, S.; Altarriba, M.; Canals, R.; Shaw, J. G. & Tomás, J. M. (2003) Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00418-X. *FEMS microbiology letters*, **224**: 77-83. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00418-X.
  151. Abdel-Baky, R. M.; Ali, M. A.; Abuo-Rahma, G. E.-D. A. A. & AbdelAziz, N. (2017) Inhibition of Urease Enzyme Production and some Other Virulence Factors Expression in *Proteus mirabilis* by N-Acetyl Cysteine and Dipropyl Disulphide. *Advances in microbiology, infectious diseases and public health*, **7**: 99–113. DOI: 10.1007/5584\_2016\_197.
  152. Bettencourt, P.; Pires, D.; Carmo, N. & Anes, E. (2010) Application of confocal microscopy for quantification of intracellular mycobacteria in macrophages. *Microscopy: science, technology, applications and education*, **1**. Pp: 614-621. Eds: Méndez-Vilas, A. & Diaz, J. Disponível em formato digital em: <http://www.formatex.info/microscopy4/614-621.pdf>.
  153. Todar, K. (2012) *Todar's online textbook of bacteriology*. Disponível em: [http://textbookofbacteriology.net/kt\\_toc.html](http://textbookofbacteriology.net/kt_toc.html). Acesso a 22 de dezembro de 2018.
  154. Stepanović, S.; Vuković, D.; Dakić, I.; Savić, B. & Švabić-Vlahović, M. (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, **40** (2): 175–179. DOI: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6.



155. ACEA BIO – ACEA BIOSCIENCES, Inc. (2013) Real-time and dynamic monitoring of cell proliferation and viability for adherent cells. *Application note n.1*. Disponível em formato digital em: <https://www.aceabio.com/wp-content/uploads/Monitoring-Cell-Proliferation-and-Viability-for-Adherent-Cells.pdf>.
156. Dantigny, P. J. (1998) Dimensionless analysis of the microbial growth rate dependence on sub-optimal temperatures. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, **21**: 215–218. DOI: 10.1038/sj.jim.2900572.
157. Jobling, M. (1981) Temperature tolerance and the final preferendum-rapid methods for the assessment of optimum growth. *Journal of fish biology*, **19**: 439–455. Disponível em formato digital em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.387.3465&rep=rep1&type=pdf>.
158. Schiraldi, C. & De Rosa, M. (2014) Mesophilic Organisms. *Encyclopedia of membranes*, 1–2. DOI: 10.1007/978-3-642-40872-4\_1610-2.
159. Ishii, S. & Sadowsky, M. J. (2008) *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes and environments*, **23** (2): 101–108. DOI: 10.1264/jsme2.23.101.
160. Than, A. A. (2011) Effect of Temperatures on the Growth of *Escherichia coli* from Water. *Universities research journal*, **4** (2): 163–171. Disponível em formato digital em: [http://www.myanmar-education.edu.mm/wp-content/uploads/2013/05/15\\_Aye\\_Aye\\_Than.pdf](http://www.myanmar-education.edu.mm/wp-content/uploads/2013/05/15_Aye_Aye_Than.pdf).
161. Meng, L.; Zhang, Y.; Liu, H.; Zhao, S.; Wang, J. & Zheng, N. (2017) Characterization of *Pseudomonas* spp. and Associated Proteolytic Properties in Raw Milk Stored at Low Temperatures. *Frontiers in microbiology*, **8**. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02158.
162. Wu, M. & Li, X. (2015) *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular medical microbiology*, 1547–1564. DOI: 10.1016/b978-0-12-397169-2.00087-1.
163. Munna, M. S.; Zeba, Z. & Noor, R. (2016) Influence of temperature on the growth of *Pseudomonas putida*. *Stamford journal of microbiology*, **5** (1): 9–12. DOI: 10.3329/sjm.v5i1.26912.
164. Moore, E. R. B.; Tindall, B. J.; Martins Dos Santos, V. A. P.; Pieper, D. H.; Ramos, J.-L. & Palleroni, N. J. (2006) Nonmedical: *Pseudomonas*. *The prokaryotes*, 646–703. DOI: 10.1007/0-387-30746-x\_21.
165. Hänninen, M.-L.; Salmi, S. & Siitonen, A. (1995) Maximum growth temperature ranges of *Aeromonas* spp. isolated from clinical or environmental sources. *Microbial ecology*, **29** (3): 259–267. DOI: 10.1007/bf00164889.
166. Tsuji, A.; Kaneko, Y.; Takahashi, K.; Ogawa, M. & Goto, S. (1982) The effects of temperature and ph on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods. *Microbiology and immunology*, **26** (1): 15–24. Disponível em formato digital em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1348-0421.1982.tb00149.x>.
167. Abbas, S. Z.; Riaz, M.; Ramzan, N.; Zahid, M. T.; Shakoory, F. R. & Rafatullah, M. (2014) Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater. *Brazilian journal of microbiology*, **45** (4): 1309–1315. DOI: 10.1590/s1517-83822014000400022.
168. Ingraham, J. L.; Maaløe, O. & Neidhardt, F. C. (1983) *Growth of the bacterial cell*. 435 pp. Sinauer Associates. Estados Unidos da América, Michigan.
169. Anderl, J. N.; Zahller, J.; Roe, F. & Stewart, P. S. (2003) Role of Nutrient Limitation and Stationary-Phase Existence in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **47** (4): 1251–1256. DOI: 10.1128/aac.47.4.1251-1256.2003.
170. Fossum, S.; Crooke, E. & Skarstad, K. (2007) Organization of sister origins and replisomes during multifork DNA replication in *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, **26** (21): 4514–4522. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601871.

171. LeBauve, A. E. & Wargo, M. J. (2012) Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protocols in microbiology*, **25**: 6E.1.1-6E.1.8. DOI: 10.1002/9780471729259.mc06e01s25.
172. Tricot, C.; STALON, V. & LEG RAIN, C. (1991) Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* mutants affected in arginine, ornithine and citrulline catabolism: function of the arginine oxidase and arginine succinyltransferase pathways. *Microbiology*, **137**: 2911-2918. DOI: 10.1099/00221287-137-12-2911.
173. West, T. P. (2010). Effect of carbon source on pyrimidine biosynthesis in *Pseudomonas oryzae*. *Journal of basic microbiology*, **50** (4): 397–400. DOI: 10.1002/jobm.201000022.
174. Palumbo, S. A.; Williams, A. C.; Buchanan, R. L. & Phillips, J. G. (1991) Model for the Aerobic Growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *Journal of food protection*, **54** (6): 429–435. DOI: 10.4315/0362-028x-54.6.429.
175. ICMSF - International commission on microbiological specifications for foods (1996) Characteristics of microbial pathogens. *Microorganisms in foods*, **5**. 514 pp. Kluwer academic/Plenum publishers.
176. Regué, M.; Hita, B.; Piqué, N.; Izquierdo, L.; Merino, S.; Fresno, S.; Javier Benedí, V. & Tomás, J. M. (2004) A Gene, *uge*, is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence. *Infection and immunity*, **72** (1): 54-61. DOI: 10.1128/IAI.72.1.54–61.2004.
177. Bandeira, M.; Carvalho, P. A.; Duarte, A.; Jordao, L. (2014) Exploring dangerous connections between *Klebsiella pneumoniae* biofilms and healthcare-associated infections. *Pathogens*, **3** (3): 720–731. DOI: 10.3390/pathogens3030720.
178. Fernandes, V.; Paulino, S.; Costa, C.; Rodrigues, J. C.; Reis, L.; Nogueira, I.; Carvalho, P.; Duarte, A. & Jordão, L. (2015) Avaliação do risco para a saúde pública resultante do contacto com águas recreativas e ornamentais. *Boletim epidemiológico observações*, **4** (12): 7-11. Disponível em formato digital em: [http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/3031/3/Boletim\\_Epidemiologico\\_Observacoes\\_N12\\_abril-junho\\_2015\\_artigo2.pdf](http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/3031/3/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_N12_abril-junho_2015_artigo2.pdf).
179. Subtil, J.; Bajanca-Lavado, M. P.; Rodrigues, J. C.; Duarte, A.; Reis, L.; Nogueira, I. & Jordão, L. (2018) Prospective observational study of adenoidal biofilms in a paediatric population and their clinical implications. *Polish journal of otolaryngology*, **73** (1): 1-7. DOI: 10.5604/01.3001.0012.5278.
180. Gabriliska, R. A. & Rumbaugh, K. P. (2015) Biofilm models of polymicrobial infection. *Future microbiology*, **10** (12): 1997–2015. DOI: 10.2217/fmb.15.109.
181. Coenye, T., & Nelis, H. J. (2010) *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, **83** (2): 89–105. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.08.018.
182. Ramstedt, M.; Ribeiro, I. A. C.; Bujdakova, H.; Mergulhão, F. J. M.; Jordao, L.; Thomsen, P.; Alm, M.; Burmølle, Vladkova, T.; Can, F.; Reches, M.; Riiool, M.; Barros, Al.; Reis, R. L.; Meaurio, E.; Kikhney, J.; Moter, A.; Zaat, S. A. J. & Sjollem, J. (2019) Evaluating Efficacy of Antimicrobial and Antifouling Materials for Urinary Tract Medical Devices: Challenges and Recommendations. *Macromolecular bioscience*, 1800384. DOI: 10.1002/mabi.201800384.
183. González-Rivas, F.; Ripolles-Avila, C.; Fontecha-Umaña, F.; Ríos-Castillo, A. G. & Rodríguez-Jerez, J. J. (2018) Biofilms in the Spotlight: Detection, Quantification, and Removal Methods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. DOI: 10.1111/1541-4337.12378.
184. Gavín, R.; Rabaan, A. A.; Merino, S.; Tomás, J. M.; Gryllos, I. & Shaw, J. G. (2002) Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Molecular microbiology*, **43**: 383–397. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02750.x.

185. Fraser, G. M. & Hughes, C. (1999) Swarming motility. *Current opinion in microbiology*, **2** (6): 630–635. DOI: 10.1016/s1369-5274(99)00033-8.
186. Henrichsen, J. (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews*, **36** (4): 478–503. Disponível em formato digital em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC408329/pdf/bactrev00201-0073.pdf>.
187. Matsuyama, T. & Matsushita, M. (2001) Population morphogenesis by cooperative bacteria. *Forma*, **16**: 307–26. Disponível em formato digital em: <http://www.scipress.org/journals/forma/pdf/1604/16040307.pdf>.
188. Toguchi, A.; Siano, M.; Burkart, M. & Harshey, R. M. (2000) Genetics of Swarming Motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: Critical Role for Lipopolysaccharide. *Journal of bacteriology*, **182** (22): 6308–6321. DOI: 10.1128/jb.182.22.6308-6321.2000.
189. Tolker-Nielsen, T.; Christensen, A. B.; Holmstrom, K.; Eberl, L.; Rasmussen, T. B.; Sternberg, C.; Heydorn, A.; Molin, S. & Givskov, M. (2000) Assessment of flhDC mRNA Levels in *Serratia liquefaciens* Swarm Cells. *Journal of bacteriology*, **182** (10): 2680–2686. DOI: 10.1128/jb.182.10.2680-2686.2000.
190. Ben-Jacob, E.; Cohen, I. & Gutnick, D. L. (1998) Cooperative Organization Of Bacterial Colonies: From Genotype to Morphotype. *Annual review of microbiology*, **52** (1): 779–806. DOI: 10.1146/annurev.micro.52.1.779.
191. Carabarin-Lima, A.; León-Izurieta, L.; Rocha-Gracia, R. C.; Castañeda-Lucio, M.; Torres, C.; Gutiérrez-Cazarez, Z.; González-Posos, S.; Martínez de la Peña, C. F.; Martínez-Laguna, Y. & Lozano-Zarain, P. (2016) First evidence of polar flagella in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient with neonatal sepsis. *Journal of medical microbiology*, **65**: 729–737. DOI: 10.1099/jmm.0.000291.
192. Kirov, S. M.; Tassell, B. C.; Semmler, A. B.; O'Donovan, L. A.; Rabaan, A. A. & Shaw, J. G. (2002) Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *Journal of bacteriology*, **184** (2): 547–555. DOI: 10.1128/JB.184.2.547-555.2002.
193. Swiecicki, J.-M.; Sliusarenko, O. & Weibel, D. B. (2013) From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions. *Integrative biology*, **5** (12), 1490. DOI: 10.1039/c3ib40130h.
194. Kearns, D. B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews microbiology*, **8** (9): 634–644. DOI: 10.1038/nrmicro2405.
195. Kojima, M.; Kubo, R.; Yakushi, T.; Homma, M. & Kawagishi, I. (2007) The bidirectional polar and unidirectional lateral flagellar motors of *Vibrio alginolyticus* are controlled by a single CheY species. *Molecular microbiology*, **64** (1): 57–67. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05623.x.
196. Adler, J. (1966) Chemotaxis in Bacteria. *Science*, **153** (3737): 708–716. DOI: 10.1126/science.153.3737.708.
197. Hughes, W. H. (1957) A Reconsideration of the Swarming of *Proteus vulgaris*. *Journal of general microbiology*, **17** (1): 49–58. DOI: 10.1099/00221287-17-1-49.
198. Wood, T. K.; González Barrios, A. F.; Herzberg, M. & Lee, J. (2006) Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, **72** (2): 361–367. DOI: 10.1007/s00253-005-0263-8
199. Gong, T.; Xu, X.; Che, Y.; Liu, R.; Gao, W.; Zhao, F.; Yu, H.; Liang, J.; Xu, P.; Song, C. & Yang, C. (2017) Combinatorial metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for efficient mineralization of 1,2,3-trichloropropane. *Scientific reports*, **7** (1). DOI: 10.1038/s41598-017-07435-x.
200. Martínez-García, E.; Nikel, P. I.; Chavarría, M. & de Lorenzo, V. (2014) The metabolic cost of flagellar motion in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, **16** (1): 291–303. DOI: 10.1111/1462-2920.12309.

201. Kelly-Wintenberg, K.; Anderson, T. & Montie, T. C. (1990) Phosphorylated Tyrosine in the Flagellum Filament Protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, **172** (9): 5135-5139. DOI: 0021-9193/90/095135-05\$02.00/0.
202. Bartholomew, J. W. (1949) Flagellation of Certain Species of *Pseudomonas* as seen with the Electron Microscope. *Journal of general microbiology*, **3** (3): 340–346. DOI: 10.1099/00221287-3-3-340.
203. Murray, T. S.; Ledizet, M. & Kazmierczak, B. I. (2010) Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of medical microbiology*, **59** (5): 511–520. DOI: 10.1099/jmm.0.017715-0.
204. Caiazza, N. C.; Merritt, J. H.; Brothers, K. M. & O'Toole, G. A. (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology*, **189** (9), 3603–3612. DOI: 10.1128/JB.01685-06.
205. Elias, S. & Banin, E. (2012) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, **36** (5): 990–1004. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x.
206. Hibbing, M. E.; Fuqua, C.; Parsek, M. R. & Peterson, S. B. (2009) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews microbiology*, **8** (1): 15–25. DOI: 10.1038/nrmicro2259.
207. Ren, D.; Madsen, J. S.; Sørensen, S. J. & Burmølle, M. (2015) High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *The ISME journal*, **9**: 81-89. DOI: 10.1038/ismej.2014.96.
208. Aas, J. A.; Paster, B. J.; Stokes, L. N.; Olsen, I. & Dewhirst, F. E. (2005) Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of clinical microbiology*, **43** (11): 5721–5732. DOI: 10.1128/jcm.43.11.5721-5732.2005.
209. Navidinia, M. (2016) The Clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *Journal of paramedical sciences*, **7** (3): 43-47. DOI: 10.22037/jps.v7i3.12584.
210. Santajit, S. & Indrawattana, N. (2016) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed research international*, 2016, 1–8. DOI: 10.1155/2016/2475067.
211. Burmølle, M.; Webb, J. S.; Rao, D.; Hansen, L. H.; Sørensen, S. J. & Kjelleberg, S. (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and environmental microbiology*, **72** (6): 3916-3923. DOI: 10.1128/aem.03022-05.
212. Palma-Martínez, I.; Guerrero-Mandujano, A.; Ruiz-Ruiz, M. J.; Hernández-Cortez, C.; Molina-López, J.; Bocanegra-García, V. & Castro-Escarpulli, G. (2016) Active Shiga-Like Toxin Produced by Some *Aeromonas* spp., isolated in Mexico City. *Frontiers in microbiology*, **7**. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01522.
213. Yang, L.; Liu, Y.; Wu, H.; Høiby, N.; Molin, S. & Song, Z-J. (2011) Current understanding of multi-species biofilms. *International journal of oral science*, **3**: 74-81. Disponível em formato digital em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3469880/pdf/ijos201112a.pdf>.
214. Kindschuh, M.; Pickering, L. K.; Cleary, T. G. & Ruiz-Palacios, G. (1987) Clinical and biochemical significance of toxin production by *Aeromonas hydrophila*. *Journal of clinical microbiology*, **25** (5): 916-921. Disponível em formato digital em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC266117/pdf/jcm00089-0180.pdf>.
215. Madsen, J. S.; Røder, H. L.; Russel, J.; Sørensen, H.; Burmølle, M. & Sørensen, S. J. (2016) Coexistence facilitates interspecific biofilm formation in complex microbial communities. *Environmental microbiology*, **18** (8): 2565-2574. DOI: 10.1111/1462-2920.13335.
216. Bansal, S.; Harjai, K. & Chhibber, S. (2015) *Aeromonas punctata* derived depolymerase improves susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* biofilm to gentamicin. *BMC microbiology*, **15**: 119. DOI: 10.1186/s12866-015-0455-z.

217. Bansal, S.; Soni, S. K.; Harjai, K. & Chhibber, S. (2013) *Aeromonas punctata* derived depolymerase that disrupts the integrity of *Klebsiella pneumoniae* capsule: optimization of depolymerase production. *Journal of basic microbiology*, **54** (7): 711–720. DOI: 10.1002/jobm.201300356.
218. Struve, C. & Krogfelt, K. A. (2004) Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environmental microbiology*, **6** (6): 584–590. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00590.x.
219. Brown, C. & Seidler, R. J. (1973) Potential Pathogens in the Environment: *Klebsiella pneumoniae*, a Taxonomic and Ecological Enigma. *Applied microbiology*, **25** (6): 900-904. Disponível em formato digital em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC380937/pdf/applmicro00058-0070.pdf>.
220. Kim, S. K. & Lee, J. H. (2016) Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of microbiology*, **54** (2): 71–85. DOI: 10.1007/s12275-016-5528-7.
221. Talagrand-Reboul, E.; Jumas-Bilak, E. & Lamy, B. (2017) The Social Life of *Aeromonas* through Biofilm and *Quorum Sensing* Systems. *Frontiers in microbiology*, **8**. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00037.
222. Ferrer, M. D.; Lamarche, B. & Mira, A. (2017) Studying Bacterial Biofilms Using Cellular Impedance. *Application note n. 17*. Disponível em formato digital em: <https://www.aceabio.com/wp-content/uploads/xCELLigenceAppNoteBioFilmSept.pdf>.
223. ACEA BIO – ACEA BIOSCIENCES, Inc. (n.d) xCELLigence RTCA MP Real Time Cell Analyzer – Multiple Plates. Disponível em: <https://www.aceabio.com/products/rtca-mp/>. Acesso a 15 de janeiro de 2019.
224. Gutiérrez, D.; Fernández, L.; Martínez, B.; Ruas-Madiedo, P.; García, P. & Rodríguez, A. (2017) Real-Time Assessment of *Staphylococcus aureus* Biofilm Disruption by Phage-Derived Proteins. *Frontiers in microbiology*, **8**: 1632. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01632.
225. Gutiérrez, D.; Hidalgo-Cantabrana, C.; Rodríguez, A.; García, P. & Ruas-Madiedo, P. (2016) Monitoring in real time the formation and removal of biofilms from clinical related pathogens using an impedance-based technology. *PLoS ONE*, **11** (10): e0163966. DOI: 10.1371/journal.pone.0163966.
226. Van Duuren, J. B. J. H.; Müsken, M.; Karge, B.; Tomasch, J.; Wittmann, C.; Häussler, S. & Brönstrup, M. (2017) Use of Single-Frequency Impedance Spectroscopy to Characterize the Growth Dynamics of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*, **7**: 5223. DOI: 10.1038/s41598-017-05273-5.
227. Bruchmann, J.; Sachsenheimer, K.; Rapp, B. E. & Schwartz, T. (2015) Multi-Channel Microfluidic Biosensor Platform Applied for Online Monitoring and Screening of Biofilm Formation and Activity. *PLOS ONE*, **10** (2): e0117300. DOI: 10.1371/journal.pone.0117300.
228. Lopes, S. P.; Azevedo, N. P. & Pereira, M. O. (2018) Quantitative assessment of individual populations within polymicrobial biofilms. *Scientific reports*, **8**: 9494. DOI: 10.1038/s41598-018-27497-9.
229. Dalton, T.; Dowd, S. E.; Wolcott, R. D.; Sun, Y.; Watters, C.; Griswold, J. A. & Rumbaugh, K. P. (2011) An *In Vivo* Polymicrobial Biofilm Wound Infection Model to Study Interspecies Interactions. *PLOS ONE*, **6** (11): e27317. DOI: 10.1371/journal.pone.0027317.
230. Smith, C. J. & Osborn, A. M. (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR) -based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, **67** (1): 6–20. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.



## Anexos

Anexo I – Deslizamento em meio semi-sólido.

Tabela I.1 – Distâncias de deslizamento.

Isolados		18 horas		5 dias
		25 °C	37 °C	25 °C
Espécie	ID	Ø médio (cm) ± dp		Ø (cm)
<i>E. coli</i>	41	5,6 ± 0,1	8,3 ± 0,0	8,5
	42	2,4 ± 0,1	6,3 ± 0,7	9,0
	43	2,8 ± 0,2	7,5 ± 0,4	8,5
<i>P. aeruginosa</i>	51	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,7
<i>P. putida</i>	52	1,2 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,5
	53	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	9,0
<i>P. oryzae</i>	57	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	9,0
<i>A. veronii</i>	13	1,2 ± 0,2	2,9 ± 0,1	3,9
<i>A. sobria</i>	15	0,8 ± 0,0	1,4 ± 0,1	2,7
	16	2,0 ± 0,1	8,2 ± 0,0	3,5
	19	2,1 ± 0,1	6,8 ± 1,0	3,0
<i>A. hydrophila/caviae</i>	24	1,9 ± 0,2	3,9 ± 0,1	3,0
<i>A. sobria</i>	29	1,7 ± 0,0	3,1 ± 0,1	1,7
	32	3,1 ± 0,1	3,1 ± 0,2	9,0
<i>K. pneumoniae</i>	45	5,0 ± 0,1	9,0 ± 0,0	9,0
	46	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,1
	47	4,7 ± 0,2	9,0 ± 0,0	9,0
	48	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,6
	49	7,1 ± 0,1	1,0 ± 0,3	7,1
	50	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,4

Foram utilizadas placas de petri com um diâmetro (Ø) de 9,0 centímetros.